

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ
FEN BİLİMLERİ ANA BİLİM DALI
Danışman: Yrd. Doç. Dr. Gönül FİLOĞLU

**D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441, D1S1677
YENİ MİNİ STR LOKUSLARININ KAN VE KAN
LEKELERİNDE OPTİMİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğba ÜNSAL
Biyolog

İstanbul – 2011

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından desteklenmiştir.

Proje Numarası: 4046

TEŞEKKÜR

*İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü'nde yüksek lisans eğitimine başlamama ve tez çalışmasını gerçekleştirmeme imkân sunan İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Müdürü **Prof. Dr. İmdat***

***ELMAS** ve Fen Bilimleri Anabilim Dalı Başkanı hocamız*

Prof. Dr. Salih CENGİZ'e,

Lisansüstü eğitimim süresince ilgisini, bilgisini ve sevgisini benden esirgemeyen, tezimin hazırlanmasında tüm özverisiyle değerli zamanını bana harcamaktan hiç çekinmeyen ve tez süresince tüm desteğiyle yanımda olan kendime örnek aldığım

sevgili danışmanım, hocam,

Yrd. Doç. Dr. Gönül FİLOĞLU'na,

Bilgi ve birikimini benimle paylaşarak yol gösteren

Yrd. Doç Dr. Havva ALTUNÇUL'a,

*Laboratuar deneyimleriyle her zaman yanımda olan, yardım etmekten hiç çekinmeyen, vaktinin büyük kısmını bana harcayan **Gülten RAYİMOĞLU'na,***

*Laboratuarda birbirimize destek olarak, omuz omuza çalıştığım arkadaşlarım **Elif SİPAHİ, Ayşegül Merve ÖLÇEN ve Selçuk ERDEM'e***

Ve beni en iyi şekilde yetiştirerek bugünlere getiren, maddi ve manevi her zaman arkamda olan, sevgi ve desteğini benden hiç esirgemeyen sevgili aileme -

'ANNEM' ve Abim'e,

Sonsuz teşekkür ederim.

Tuğba ÜNSAL

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Adli Bilimlerde Kullanılan STR CODIS Lokusları	11
Tablo 2. 16 STR Lokusunun Küçültülmesiyle Oluşturulan MiniSTR Primer Dizisi	16
Tablo 3. 16 STR Lokusunun MiniSTR Haline Getirilmesiyle Yeni Primerlerle Oluşan PCR Ürün Boyutları	16
Tablo 4. 26 Yeni MiniSTR Lokusunun Özellikleri	20
Tablo 5. Yeni MiniSTR Primer Özellikleri	22
Tablo 6. Çeşitli Biyolojik Delillerin İçerdiği DNA Miktarı	23
Tablo 7. PCR' da Kullanılan Floresan İşaretli Primer Baz Dizileri	36
Tablo 8. NC01 ve NC02'nin Primer Konsantrasyonları	37
Tablo 9. Lokusların Büyüklük (Size) ve Alel Aralığı	38
Tablo 10: 30 kişiye ait kan örneklerinde 6 miniSTR lokusuna ait DNA profili	49
Tablo 11: 1 Hafta Bekletilmiş Örneklerde 6 miniSTR Lokusna Ait Alel Profili	51
Tablo 12: 1 Ay Bekletilmiş Örneklerde 6 miniSTR Lokusna Ait Alel Profili	51
Tablo 13: 3 Ay Bekletilmiş Örneklerde 6 miniSTR Lokusna Ait Alel Profili	52
Tablo 14: 6 ay Bekletilmiş Örneklerde 6 miniSTR Lokusna Ait Alel Profili	52
Tablo 15: Karışım Örneklerde Alel Tipleri	57
Tablo 16: 6 miniSTR Lokusunun DNA Oranlarına Göre Hassasiyet Sonuçları	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. HumF13B STR lokusu	7
Şekil 2. THO1 STR lokusu	8
Şekil 3. Kromozomal Pozisyonları İle 13 Temel CODIS STR Lokusları	10
Şekil 4. AmpFISTR® Identifiler PCR Amplification Kit (Applied Biosystems)	12
Şekil 5. PowerPlex® 16 System Kit (Promega)	12
Şekil 6. Investigator IDplex Kit(Qiagen)	12
Şekil 7. D7S820 Lokusu Primerinin 5' Ucuna GTTTCTT Kuyruğu Eklenmesiyle Oluşturulan MiniSTR'ye Ait Elektroforegram	15
Şekil 8. D16S539 Lokusunun Klasik STR Kiti Kullanarak Ve MiniSTR Haline Gelmesiyle Elde Edilen Elektroforegram Karşılaştırması	17
Şekil 9. Yeni mini STR oluşturma basamakları	18
Şekil 10. Lokusların Kromozom Üzerindeki Pozisyonları	21
Şekil 11. Pozitif Kontrol DNA Genotipleri	40
Şekil 12. Applied Biosystems'in ABI PRISM® 310 İçin Standart Boya Setleri	41
Şekil 13. NC01 Multipleksinin D10S1248 1,3 µm, D14S1434 1,3 µm ve D22S1045 0,8 µm Konsantrasyonları Kullanılarak Yapılan Çalışma	43
Şekil 14. NC02 Multipleksinin D10S1248 1,3 µm, D14S1434 1,3 µm ve D22S1045 0,8 µm Konsantrasyonları Kullanılarak Yapılan Çalışma	44

Şekil 15. D1S1677 Lokusunun 1,5 µM Primer Konsantrasyonunda Elde Edilen Elektroforegramı	45
Şekil 16. D2S441 Lokusunun 1,7 µM Primer Konsantrasyonunda Elde Edilen Elektroforegramı	45
Şekil 17. D4S2364 Lokusunun 1,3 µM Primer Konsantrasyonunda Yapılan Çalışma Sonucuna Ait Elektroforegramı	46
Şekil 18. D10S1248 Lokusunun 1,6 µM Primer Konsantrasyonunda Yapılan Çalışma Sonucuna Ait Elektroforegramı	46
Şekil 19. D14S1434 Lokusunun 1,8 µM Primer Konsantrasyonunda Yapılan Çalışma Sonucuna Ait Elektroforegramı	46
Şekil 20. D22S1045 Lokusunun 1,5 µM Primer Konsantrasyonunda Yapılan Çalışma Sonucuna Ait Elektroforegramı	46
Şekil 21. NC01 Multipleksinin D10S1248 1,6 µM, D14S1434 1,8 µM, D22S1045 1,5 µM Konsantrasyonlarında Yapılan Çalışma Sonucuna Ait Elektroforegramı	48
Şekil 22. NC02 Multipleksinin D1S1677 1,5 µM, D2S441 1,7 µM, D4S2364 1,3 µM Konsantrasyonlarında Yapılan Çalışma Sonucuna Ait Elektroforegramı	48
Şekil 23. Taze Kan Lekelerinin NC01 Multipleksine Ait Elektroforegramı	50
Şekil 24. Taze Kan Lekelerinin NC02 Multipleksine Ait Elektroforegramı	50
Şekil 25. 1 Hafta Bekletilmiş Kan Lekesinin NC01 Multipleksine Ait Elektroforegramı	53
Şekil 26. 1 Hafta Bekletilmiş Kan Lekesinin NC02 Multipleksine Ait Elektroforegramı	53
Şekil 27. 1 Ay Bekletilmiş Kan Lekesinin NC01 Multipleksine Ait Elektroforegramı	54

Şekil 28. 1 Ay Bekletilmiş Kan Lekesinin NC02 Multipleksine Ait Elektroforegramı	54
Şekil 29. 3 Ay Bekletilmiş Kan Lekesinin NC01 Multipleksine Ait Elektroforegramı	55
Şekil 30. 3 Ay Bekletilmiş Kan Lekesinin NC02 Multipleksine Ait Elektroforegram	55
Şekil 31. 6 Ay Bekletilmiş Kan Lekesinin NC01 Multipleksine Ait Elektroforegram	56
Şekil 32. 6 Ay Bekletilmiş Kan Lekesinin NC02 Multipleksine Ait Elektroforegram	56
Şekil 33. 1/100 Karışım Örneğinde NC01 Multipleksine Ait Elektroforegram	58
Şekil 34. 1/100 Karışım Örneğinde NC02 Multipleksine Ait Elektroforegram	58
Şekil 35. 0,5 ng/µl DNA Konsantrasyonunda NC01 Multipleksine Ait Elektroforegram	60
Şekil 36. 0,1 ng/µl DNA Konsantrasyonunda NC01 Multipleksine Ait Elektroforegram	60
Şekil 37. 0,05 ng/µl DNA Konsantrasyonunda NC01 Multipleksine Ait Elektroforegram	61
Şekil 38. 0,025 ng/µl DNA Konsantrasyonunda NC01 Multipleksine Ait Elektroforegram	61
Şekil 39. 0,005 ng/µl DNA Konsantrasyonunda NC01 Multipleksine Ait Elektroforegram	62
Şekil 40. 0,5 ng/µl DNA Konsantrasyonunda NC02 Multipleksine Ait Elektroforegram	62
Şekil 41. 0,1 ng/µl DNA Konsantrasyonunda NC02 Multipleksine Ait Elektroforegram	63
Şekil 42. 0,05 ng/µl DNA Konsantrasyonunda NC02 Multipleksine Ait Elektroforegram	63

Şekil 43. 0,025 ng/µl DNA Konsantrasyonunda NC02 Multipleksine Ait Elektroforegram

64

Şekil 44. 0,005 ng/µl DNA Konsantrasyonunda NC02 Multipleksine Ait Elektroforegram

64

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Adli Genetik Çalışmaların Tarihsel Gelişimi	3
2.2. STR Lokusları	6
2.2.1. STR Lokusu Alellerinin Adlandırılması	7
2.2.2. Adli Amaçlı DNA Analizlerinde Yaygın Olarak Kullanılan STR Lokusları	8
2.2.3. CODIS (Birleşik DNA İndeks Sistemi- Combined DNA Index System)	9
2.2.3.1. Adli Bilimlerde Kullanılan CODIS STR Lokuslarını İçeren Multipleks PCR Ticari Kitleri	12
2.2.4. Klasik STR Lokuslarından MiniSTR Lokuslarının Oluşturulması	13
2.2.4.1. Yeni miniSTR'lerin Oluşturulma Basamakları	17
2.2.5. CODIS Dışı Yeni Mini STR Lokusları	18
2.2.6. Yeni Mini STR Lokusların Primer Dizaynları	21
2.3. Biyolojik Deliller ve DNA Kaynakları	22
2.3.1. Olay Yerindeki Biyolojik Delillerinin Toplanması ve Saklanması	23
2.3.2. Kan ve Kan Lekelerinin Toplanması Sırasında Yapılması Gerekenler	25
2.3.3. Biyolojik Örnekten DNA Analizini Engelleyen Faktörler	26
2.3.4. Olay Yerinden Gelen Biyolojik Örneklerin Bozulma Nedenleri	26
2.3.4.1. Kontaminasyon (Bulaşma)	27
2.3.4.1.1. Kontaminasyonun Nedenleri	27
2.3.4.1.2. Kontaminasyonun DNA Sonuçlarına Etkisi	29
2.3.4.2. Degredasyon (Bozunma)	30
3. MATERYAL VE METOT	31
3.1. DNA Örnekleri	31
3.1.1. Taze Kan Örnekleri	31
3.1.2. Çeşitli Yüzeyler Üzerinde Bekletilmiş Kan Lekeleri	31
3.2. Kullanılan Kit ve Kimyasallar	31
3.3. Kullanılan Cihazlar	32

3.4. Metodun Uygulanması	32
3.4.1. Kan ve Kan Lekelerinden DNA İzolasyonu	32
3.4.1.1. QIAamp® DNA Mini Kit İle Kurumuş Kan Lekelerinden DNA İzolasyonu	33
3.4.1.2. QIAamp® DNA Micro Kit İle Çeşitli Yüzeyler Üzerinde Bekletilmiş Kan Lekelerinden DNA İzolasyonu	33
3.4.2. DNA Miktar Tayini	34
3.4.2.1. The Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit ile DNA İzolatlarının Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	35
3.4.3. PCR Aşaması	35
3.4.3.1. Primerlerin Sulandırılması	35
3.4.3.2. Primer Konsantrasyonları	36
3.4.3.3. Primer Karışımının Hazırlanması	37
3.4.3.4. PCR Programı	38
3.4.4. PCR Ürünlerinin ABI 310 Genetik Analizör Cihazında Analizi	38
3.4.4.1. Örnek Hazırlanması	38
3.4.4.2. Örneklerin Elektroforezi	39
3.4.4.3. Örneklerin Analizi	39
3.5. D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441, D1S1677 Yeni Mini STR Lokuslarının Optimizasyonu	40
3.6. Optimizasyona Ek Yapılan Çalışmalar	42
3.6.1. Duyarlılık Çalışması	42
3.6.2. Karışım Çalışması	42
3.6.3. Tekrarlanabilirlik	42
4. BULGULAR	43
4.1. Primer Konsantrasyonları Üzerinde Yapılan Modifikasyonlar	43
4.2. 30 Kişiye Ait Kan Örneklerinde Yeni Mini STR (D1S1677, D2S441, D4S2364, D10S1248, D14S1434, D22S1045) Lokusuna Ait DNA Profilleri	49
4.3. Çeşitli Yüzeyler Üzerinde Bekletilmiş Kan Lekelerinin 6 miniSTR Lokusuna Ait DNA Tipleme	51
4.4.D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441, D1S1677 Yeni Mini STR Lokuslarının Kan ve Kan Lekelerinde Optimizasyonuna Ek Çalışmalar	57

5. TARTIŞMA VE SONUÇ	65
6. ÖZET	71
7. SUMMARY	73
8. KAYNAKLAR	75
9. EKLER	84
10. ÖZGEÇMİŞ	85

KISALTMALAR

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

AFIS: Automated Fingerprint Identification System - Otomatik Parmak İzi Belirleme Sistemi

Bç: Baz Çifti

BSA: Bovine Serum Albumin – Standart Sığır Serum Albumini

Cm: Santimetre

CODIS: Combined DNA Index Systems – Birleşik DNA İndeks Sistemi

dH₂O: Deiyonize su

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

dNTP: Deoksi Nükleotit Trifosfat

EDTA: Etilen Daimin Tetra Asetik Asit

FBI: Federal Bureau of Investigation – Fedaral Araştırma Bürosu

FSS: Forensic Science Service – Adli Bilimler Servisi

GC: Guanin- Sitozin

HumCD4: Human recognition/surface antigene gene (İnsan tanıma- yüzey antijen geni)

HumFES/FPS: Human c-fes/fpsproto-oncogene (İnsan c-fes/fpsproto – onkogeni)

HumTHO1: Human tyrosine hydroxylase gene (İnsan Tirozin Hidroksilaz geni)

HumF13A01: Human coagulation factor XIII a subunit gene (İnsan pıhtılaşma faktörü 13 a geni)

HumF13B: Human coagulation factor XIII b subunit gene (İnsan pıhtılaşma faktörü 13 b geni)

Mb: Mega baz

MgCl₂: Magnezyum Klorür

mM: Mili molar

mL: Mili litre

µm: Mikro molar

NC01: Non CODIS 01 - Codis Dışında D10S1248, D14S1434 ve D22S1045 yeni miniSTR grubu

NC02: Non CODIS 01 - Codis Dışında D1S1677, D2S441 ve D4S2364 yeni miniSTR grubu

NIST: National Institute of Standards and Technology – Uluslar arası Standartlar ve Teknolojiler Enstitüsü

ng: Nanogram

PCR: Polymerase Chain Reaction – Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Pg: Piko gram

RFU: Radio Frequency Unit – Radyo Frekans Birimi

Rpm: Revolutions Per Minute – Dakikadaki Devir Sayısı

STR: Short Tandem Repeat- Kısa Ardışık Tekrar Dizileri

V: Volt

VNTR: Variable Number Of Tandem Repeats – Değişken Sayıda Ardışık Tekrar Dizileri

U/ μ L: Mikrolitre başına düşen ünite-birim

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Adli bilimlerde babalık - akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde ve kriminal araştırmalarda olay yerinden toplanan biyolojik örneklerin (kan, kan lekesi, semen, semen lekesi, tükürük, tükürük lekesi kıl, kemik v.s) kimliklendirilmesi DNA analizleri ile yapılmaktadır (Chan L. 1992) (Robertso J. ve ark. 1990).

DNA analizlerinin adli bilimlerde uygulanmaya başlandığı ilk dönemlerde kullanılan lokusların ayırım gücünün az olması ya da ayırım gücü yüksek olanların ise iyi kalitede (parçalanmamış) ve fazla miktarda (300-500 ng) DNA'ya ihtiyaç duymaları ve analiz sürelerinin uzun olmasından dolayı yeni sistemlerin araştırılması şart olmuştur. Bu çalışmalar neticesinde de STR lokusları geliştirilmiştir.

STR lokuslarının alel büyüklüklerinin 350 bp'den (baz çiftinden) küçük olması, eski ve iyi korunmamış biyolojik örneklerde tiplene yapmaya imkan vermesi, ayrıca otomasyon ve çoklu analize imkan vermesi ayrıca pahalı donanım gerektirmemesi bu lokusların adli bilimlerde ideal genetik işaretler olmalarını sağlamıştır (Weber J.L., May P.E. 1989) (Edwards A. ve ark. 1992) (Filoğlu G. 1999).

FBI tarafından kurulan ve DNA veri bankası olan Combined DNA Index Systems (CODIS) adli bilimlerde kullanılmak üzere 13 STR lokusu belirlemiştir. Bu lokusların multipleks PCR kitleri de ticari olarak üretilmiştir. Bu lokuslar halen kullanılmakla birlikte, olay yerinden gelen aşırı derecede bozunmuş biyolojik örneklerde tiplene sorunları yaşanabilmekte ve sonuç alınamamaktadır. Bunu ortadan kaldırmaya yönelik, araştırmacılar DNA üzerinde daha az yer kaplayan ve bozunmuş örneklerde dahi tiplene imkânı veren yeni STR lokuslarını bulmak ve optimize etmek için bu konudaki çalışmalarını sürdürmektedirler (Coble M.D. ve ark. 2005).

Bu çalışmalar ışığında; CODIS içerisinde yer almayan, National Institute of Standards and Technology (NIST) tarafından 26 yeni mini STR lokusu geliştirilmiştir. Seçilen 26 bölge, 13 CODIS lokusu ile aynı kromozom üzerinde ise bu lokuslara en az ~50 Mb uzaklıkta ya da farklı kromozomlar üzerinde yerleşmiş bölgelerdir. Bu lokusların PCR ürünleri 150 baz çiftinden küçüktür. Özellikle de D10S1248, D14S1434, D22S1045,

D4S2364, D2S441, D1S1677 lokuslarının PCR ürünleri 125 bp den küçüktür. Olay yerinde bulunan eski ve bozulmuş biyolojik örneklerin DNA tiplemesine imkân verdiğinden söz konusu lokusların çeşitli ülkelerde validasyonu ve optimizasyonu yapılarak adli laboratuvarların rutin kullanımına sunulmuştur. Bu lokuslardan D10S1248, D2S441 ve D22S1045 Avrupa’da benimsenmiş ve adli laboratuvarlarda kişi identifikasyonları için kullanılan STR lokuslarına eklenmiştir (Coble M.D. ve ark. 2005) (Hill C.R. ve ark. 2006).

Bu tezin amacı; D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441, D1S1677 yeni mini STR lokuslarının Türkiye’deki adli laboratuvarlarda olay yerinden gelen, eser miktarda, iyi korunmamış ve uzun süre beklemiş örneklerde uygulanabilirliğini göstermektir. Bunun için, önce taze kan örneklerinde söz konusu lokusların optimizasyonunun yapılması; daha sonra çeşitli yüzeyler üzerinde ve değişik sürelerde bekletilmiş kan lekelerinde bu lokusların tiplemedeki hassasiyetleri saptanarak rutin adli laboratuvarlarda çalışılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Adli Genetik Çalışmalarının Tarihi Gelişimi

Temel bilimler ve tıbbi bilimlerde rutinde çeşitli amaçlarla kullanılan DNA analizleri, adli bilimlerde mahkemelere objektif deliller sunabilmek amacıyla kullanılmaktadır. DNA analizleri, adli bilimlerde babalık (paternite) tayini ve kriminal incelemelerde uygulama alanı bulmuştur. Babalık araştırmalarında, anne, şüpheli baba ve çocuktan alınan biyolojik örnekler analiz edilerek bireyin çocuğun babası olup olmayacağı saptanmaktadır. Kriminal araştırmalarda ise; olay yerinden toplanan biyolojik sıvılar ve dokular (kan, semen, tükürük, kıl, kemik vs.) ile bunlara ait leke ve artıklar kimliklendirilerek kime ait olabileceği belirlenmektedir (Chan L. 1992) (Robertson J. ve ark. 1990).

Kimliklendirme ve babalık araştırmalarında 1900'lü yılların başından itibaren öncelikle kan grupları (eritrosit antijenleri) ardından eritrosit enzimleri, serum proteinleri, hemoglobin ve lökosit antijenlerinin (Human Leukocyte Antigens - HLA) varyasyonlarından yararlanılmıştır. Bunların inceleme yöntemleri, proteinlerin elektroforetik ayırımına ve antijenlerin immünojenik reaksiyonlarına dayanmaktadır. Bu polimorfik genetik işaretler, adli bilimcilere değerli kanıtlar sağlamalarına karşın bazı dezavantajları vardır:

- Bu işaretler diğer biyolojik materyallerden ziyade taze kan örneklerinde ve kan lekelerinde etkin olarak incelenebilmektedirler.
- Varyasyon düzeyleri dolayısıyla ayırım güçlerinin sınırlı olması nedeniyle tek başlarına kullanılamamaktadırlar. Bireyin baba olma olasılığını söyleyebilmek için veya mahkemelere delil teşkil eden biyolojik materyalin zanlıya/mağdura ait olup olmayacağını söyleyebilmek için tüm antijenik ve polimorfik proteinlerin/enzimlerin çalışılması gerekmektedir.
- Antijenik ve polimorfik proteinler/enzimler biyolojik sıvılara ait lekelerde çevre koşullarına bağlı olarak kısa sürede yapısal değişikliğe uğramaktadırlar.

- Bu genetik işaretlerin incelenmesinde kullanılan yöntemlerde ise çok küçük miktardaki materyallerden sonuç almak imkânsızdır (Gaensleen R.E. 1984) (Divall G.B. 1982).
- Ayrıca her biyolojik materyalle de çalışmak mümkün değildi (Kıl, kemik, diş...).

Moleküler genetik alanında 1980’li yıllarda gerçekleştirilen ilerlemeler ile, polimorfik özelliklerin direkt olarak DNA düzeyinde incelenmesine olanak tanımıştır. İnsan genomunda bulunan yaklaşık 3 milyar baz çifti, her biri farklı lokuslarda yer alan 50,000-100,000 geni kodlamaktadır. Genlerin çoğu ayrıca “alel” olarak adlandırılan birkaç farklı formda bulunabilmektedir. Bu şekilde polimorfizm gösteren bir gen için her birey, biri anneden diğeri babadan aktarılan iki farklı alel taşıyabilirken, bir popülasyon aynı gen için çok sayıda alele sahip olabilmektedir. Bu genetik polimorfizm adli amaçlı DNA analizlerinin temelini oluşturmuştur (Robertson J. ve ark. 1990). Adli bilimlerde, tek baz değişiklikleri ve farklı sayıda art arda tekrar eden diziler (variable number of tandem repeats VNTR’s) olmak üzere iki çeşit DNA polimorfizmi çalışılmıştır (Robertson J. ve ark. 1990) (Bringmann B. 1992) (Jeffreys A.J. ve ark. 1985).

Tek baz değişikliğini içeren lokuslarda, gözlenen toplam alel sayısı az olduğundan bireyleri birbirinden ayırt etme güçleri sınırlıdır. Bu tip polimorfizm daha çok kalıtsal hastalıkların tanısında önem taşımaktadır (Robertson J. ve ark. 1990).

VNTR lokuslarındaki polimorfizm, bireyler arasında belli bir baz dizisinin art arda tekrar eden varyasyonlarından oluşmaktadır. Farklı VNTR lokuslarında, tekrarlanan baz dizisinin uzunluğu değişmektedir. Tekrarlanan baz dizisi 2-30 ya da daha fazla sayıda olabilmektedir. Bu lokuslar, çok sayıda farklı uzunlukta allele sahip olduklarından bireyleri birbirinden ayırt etme güçleri yüksektir. VNTR lokusları geçmişte adli örneklerin analizinde yaygın olarak kullanılmıştır (Robertson J. ve ark. 1990) (Bringmann B. 1992) (Jeffreys A.J. ve ark. 1985).

Günümüze kadar adli amaçlarla rutinde kullanılan DNA teknolojisinin gelişimini temel olarak dört kısımda incelemek mümkündür (Lee H.C. ve ark. 1994):

- Çoklu-lokus (multi-locus) problemlerinin kullanıldığı DNA parmak izi yöntemi (DNA fingerprinting),
- Tek-lokus (single-locus) problemlerinin kullanıldığı DNA profillemesi (DNA profiling),
- Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizminin (Amplified fragment length polymorphism - AMPFLP) analizi,
- Kısa ardışık tekrar eden dizilerin (Short Tandem Repeats - STR) analizi.

Çoklu-lokus içeren prob kullanılarak, genomdaki çeşitli minisatellit lokuslarının (Jeffreys A.J. ve ark. 1985) aynı anda incelendiği DNA parmak izi yönteminin adli bilimlerdeki ilk uygulamaları 1986'da başlamıştır (Gill P., Werrett D.J. 1987). Bu yöntem ile bireye özgü DNA profili elde edilmektedir. Popülasyondan rast gele seçilen iki kişinin (tek yumurta ikizleri hariç) aynı DNA profiline sahip olma olasılığının teorik olarak 1/30 milyar olduğu bildirilmiştir (Lee H.C. ve ark. 1994). Ancak yöntemin karmaşık, uzun zaman gerektirmesi ve 30'dan fazla DNA bandının değerlendirilmesindeki güçlükler nedeniyle çoklu-lokus içeren problemler rutinde kısa bir süre için kullanılmış ve yerini tek-lokuslu problemlerin kullanıldığı DNA profillemeye bırakmıştır. Bir tek minisatellit lokusunun incelendiği bu yöntemde, sonuçta sadece iki DNA bandı oluştuğu için değerlendirme çok daha kolay yapılabilmektedir. Çalışılan lokus sayısı artırılarak biyolojik örneğin kişiye ait olma olasılığı da yükselmektedir. Yöntemin dezavantajı ise, iyi kalitede (parçalanmamış) ve fazla miktarda (300-500 ng) DNA'ya ihtiyaç duymasındır. Ancak adli örnekler her zaman analiz için yeterli miktarda ve kalitede DNA içermeyebilirler (Robertson J. ve ark. 1990) (Lee H.C. ve ark. 1994) (Jeffreys A.J. ve ark. 1985).

Saiki ve ark. tarafından 1985 yılında nükleik asit dizilerini çoğaltabilen polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) tanımlanmasıyla, çok küçük miktarlardaki materyallerden DNA analizi çalışmaları mümkün hale gelmiştir. PCR'ye dayalı yöntemlerin (AMPFLP) 1990'larda kullanılmaya başlanmasıyla, DNA miktarı daha önceki yöntemlerde yeterli

olmayan tek bir kıl, sperm ve epitel hücresi içeren örnekler analiz edilebilmiştir (Robertson J. ve ark. 1990) (Sensabaugh G.F. 1991).

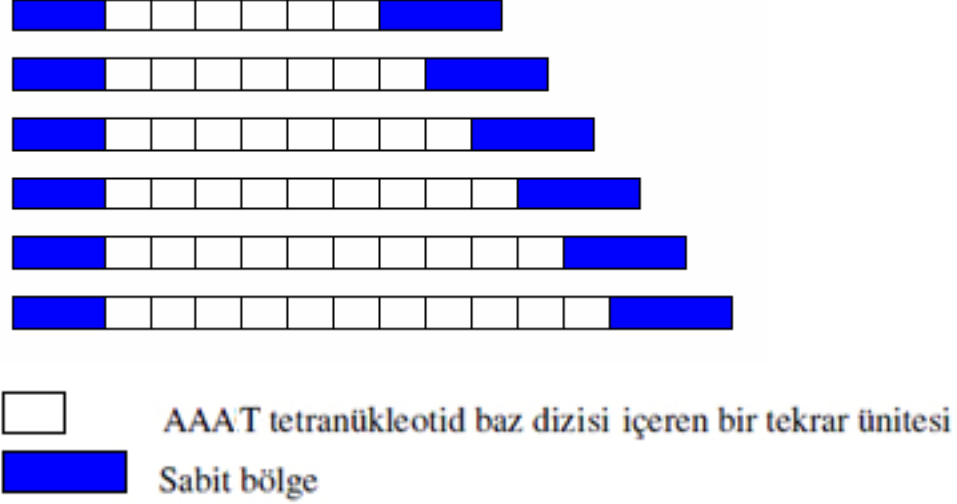
Devam eden çalışmalarla, özellikle kısa art arda tekrarlanan baz dizisi içeren STR lokuslarının PCR ile çoğaltılarak incelenebileceğinin gösterilmesi, adli amaçlı DNA analizinde yeni bir dönemin başlamasına neden olmuştur. Genomda sayılarının fazla oluşu, yüksek oranda polimorfizm göstermeleri ve inceleme kolaylığı STR'lerin adli bilimlerde ideal genetik işaretler olmasını sağlamıştır (Weber J.L., May P.E. 1989) (Edwards A. ve ark. 1992).

2.2. STR Lokusları

STR lokusları, 2-7 baz çifti uzunluğunda belli bir baz dizisinin art arda tekrarlanmasıyla oluşmaktadır (Şekil 1). STR'lerin tekrarlanan ünitesindeki baz sayısı minisatellitlerden daha az olduğu için bu lokuslara mikrosatellitler de denilmektedir. Bu bölgeler insan genomunun her tarafına dağılmış olup, her 6-10 kb'de bir görülmektedir (Weber J.L., May P.E. 1989) (Edwards A. ve ark. 1992). Bu lokusların tekrarlanan ünite sayısının bireyden bireye farklı olmasından yararlanarak, adli amaçlı kimliklendirme ve babalık belirlenmesinde kullanılmaktadır. STR lokuslarında, tekrarlanan ünite sayısının ve baz çiftinin uzunluğundan kaynaklanan değişimlerin yanı sıra bazen aynı tekrar ünitelerinde nokta mutasyonları veya insersiyon/delesyonlardan kaynaklanan baz dizisine ait farklılıklar da görülmektedir. Bu açıdan STR'leri üç grupta incelemek mümkündür (Urquhart A. ve ark. 1994) (Möller A. ve ark. 1994) (Bar W. ve ark. 1994):

- *Basit STR'ler:* Tekrar eden baz dizisinin sayısı ve sırası aynı olan STR lokuslarıdır. Ör: HumCD4 (Human recognition/surface antigene gene), HumFES/FPS (Human c-fes/fpsproto-oncogene), HumTHO1 (Human tyrosine hydroxylase gene), HumF13A01 (Human coagulation factor XIII a subunit gene), HumF13B (Human coagulation factor XIII b subunit gene) (Şekil1).

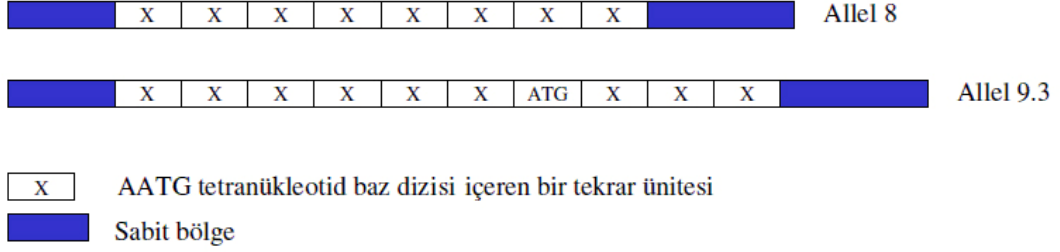
- *Bileşik STR'ler*: İki ya da daha fazla sayıda tekrar ünitelerine sahip ve bu tekrar eden baz dizisinin sırası birbirinden farklı olan STR lokuslarıdır. Ör: HumvWFA31 (Human von Willebrand factor gene),
- *Karmaşık STR'ler*: Tekrar eden baz dizisi ve sayısı farklı olan birkaç tekrar ünitesine sahip lokuslardır. Ör: D21S11.



Şekil 1. HumF13B STR lokusu

2.2.1. STR Lokusu Alellerinin Adlandırılması

Uluslararası Adli Hemogenetik Topluluğu DNA Komisyonunun 1992'de yayınladığı kararlara göre; STR lokus alelleri, içerdikleri tekrar ünitesi sayısına göre adlandırılmaktadır. Bir allel, art arda tekrarlanan 8 tane ünite içeriyorsa "8. alel" olarak adlandırılır. Bir ünitedeki baz çifti sayısı standart tekrar ünitesinden eksik olan alellerde ise tam olarak tekrarlanan ünitelerin sayısı ve eksik baz içeren ünitedeki baz sayısı yazılarak adlandırma yapılır. Bu iki değer birbirinden ondalık sayı ile ayrılır. Örneğin, dört baz çiftlik tekrar üniteleri içeren THO1 lokusunun 9.3 aleli, 10. alel'den, yedinci tekrar ünitesinde adenin kaybından dolayı 1 baz çifti daha kısadır ve bu nedenle 9.3 olarak adlandırılmıştır (Şekil 2) (Bar W. ve ark. 1994).



Şekil 2. THO1 STR lokusu

2.2.2. Adli Amaçlı DNA Analizlerinde Yaygın Olarak Kullanılan STR Lokusları

Günümüzde STR lokusları, klinik ve temel bilimlerde doku kültüründe, tür identifikasyonunda, kemik iliği transplantasyonuna yönelik analizlerde, kromozom haritalamasında, çeşitli hastalıklardan sorumlu genlerin incelenmesinde ve popülasyon genetiği çalışmalarında kullanılmaktadır. Adli araştırmalarda ise babalık tayini ve biyolojik materyallerin kimliklendirilmesinde kullanılmaktadır (Brinkmann B. 1992) (Caskey C.T. ve ark. 1992) (Shriver M.D. ve ark. 1997).

İnsan genomunda heterozigotlukları % 70'in üzerinde olan 1300'den fazla STR lokusu tanımlanmıştır. Adli araştırmalarda, DNA'nın intron bölgelerinde yer alan STR lokusları tercih edilmektedir. Adli amaçlarla rutinde kullanılacak STR lokuslarının seçiminde; lokusun bireyleri ayırma gücü, kromozomal lokalizasyonu, yapısı, diğer STR lokusları ile tek bir PCR'de çoğaltılabilirliği, güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçların elde edilebilmesi gibi kriterler göz önüne alınmaktadır (Brinkmann B. 1992) (Sprecher C.J. ve ark. 1996) (Gill P. ve ark. 1996).

STR lokuslarının keşfini takiben bazı lokusların adli amaçlı kullanılabilirlikleri ve çeşitli popülasyonlardaki gen frekansları araştırılmıştır (Urquhart A. ve ark. 1994) (Weber J.L., May, P.E. 1989) (Hammond H.A. ve ark. 1994) (Ewett I.W. ve ark. 1996). Yapılan çalışmalarla 50-100 pg DNA örneği ile STR analizi yapılabileceği saptanmıştır. Adli çalışmalarda genellikle ileri düzeyde parçalanmış ve DNA içeriği 100 ng'dan az olan biyolojik materyallerin kimliklendirilmesi gerekebilir. Diğer tüm yöntemlerle sonuç alınamayan materyaller, STR lokusları kullanılarak güvenilir sonuçlar

alınabilmektedir (Bringmann B. 1992) (Schmitt C. ve ark., 1994) (Alford R.L. ve ark. 1994).

Adli bilimlerde rutin uygulamalarda tetranükleotid (dört nükleotidlik) ve pentanükleotid (beş nükleotitlik) tekrar ünitesi içeren STR'ler tercih edilmektedir. Bu lokuslarla çalışıldığında artefakt (istenmeyen-hatalı) bantların oluşmadığı saptanmıştır (Weber J.L., May, P.E. 1989) (Edwards A. ve ark. 1992) (Sprecher C.J. ve ark. 1996).

Babalık araştırmalarında ve kriminal incelemelerde, 5-9 STR lokusu bir arada çalışıldığında bireyleri ayırt etme gücü artmaktadır. İlerleyen çalışmalarda oluşturulan çoklu (multipleks) STR sistemleri ile çok az DNA örneğinden aynı anda birkaç STR lokusunun çoğaltılması yapılabilir ve elektroforezde tek yükleme ile birçok lokus aynı anda incelenebilmektedir.

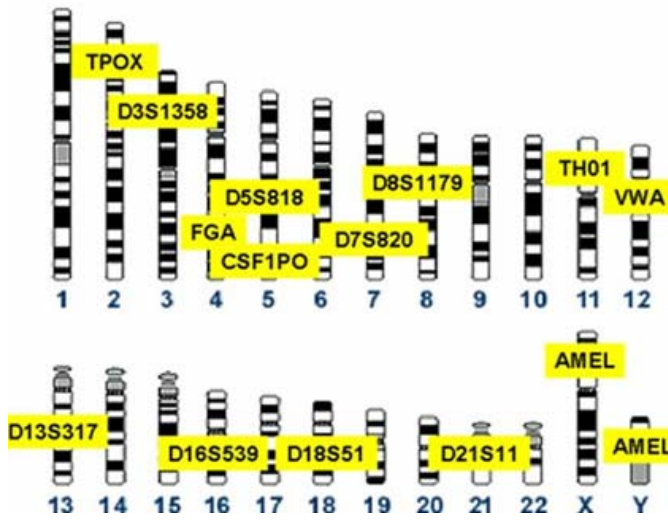
2.2.3. CODIS (Birleşik DNA İndeks Sistemi - Combined DNA Index System)

Değişik laboratuvarlarda aynı sayıda ve aynı gen bölgelerinin (lokus) çalışılmasının pratik uygulamalardaki hedefi DNA veri bankaları olmuştur. Bu standardın sağlanabilmesi için ABD'de 1997 yılında CODIS (Combined DNA Index System) adıyla bir DNA veri bankası oluşturulmuştur. CODIS sistemi içinde FBI tarafından belirlenen 13 STR lokusu yer almaktadır (Şekil 3) (Tablo 1). Bu lokusları içeren çeşitli multipleks STR kitleri ticari olarak üretilmiştir (Şekil 4, Şekil 5 ve Şekil 6).

Bu STR lokuslarının alel büyüklüklerinin 350 bp'den küçük olması, eski ve iyi korunmamış biyolojik örneklerde tiplleme yapmaya imkân vermesi, otomasyon ve çoklu analize imkân vermesi ve pahalı donanım gerektirmemesinden dolayı adli bilimler için ideal genetik işaretler haline gelmiştir. Bu lokuslar; D3S1358, VWA, FGA, D8S11179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, THO1 ve CSF1PO'dır. ABD'de 50 eyaletten elde edilen DNA profilleri ulusal veri bankasında toplanır. CODIS sisteminde barkodlanmış örneklerin DNA profilleri bilgisayar ortamında karşılaştırılır ve değerlendirilir. CODIS sistemi DNA profillerini kullanarak şüphelileri ayırt etmeye yarayan elektronik veri tabanı olup, otomatik parmak izi belirleme sistemi olan AFIS'in

bir benzeridir. Bu veri tabanı tecavüz, cinayet veya çocuk istismarı gibi suçlardan hüküm giymiş suçluların verilerinden oluşmuş olup olay yerinde bulunan örneklerin DNA profilleri de CODIS'e dahil edilmektedir (Budowle B., Moretti T.R. 1999).

Bu lokuslar halen kullanılmakla birlikte, olay yerinden gelen iyi korunmamış- bozulmuş biyolojik örneklerde tiplene sorunları yaşanabilmektedir. Bu sorunları ortadan kaldırmaya yönelik yeni miniSTR lokusları araştırılmıştır.



Şekil 3. 13 temel CODIS STR lokuslarının kromozomal pozisyonları
(Şekil <http://www.cstl.nist.gov/strbase/fbicore.htm>'den alınmıştır)

Tablo 1. Adli bilimlerde kullanılan STR CODIS lokusları

Lokus Adı	Kromozom Pozisyonu	Alelik Ladder	Primer İşaretlemede kullanılan foleresan boya
D8S1179	8q24.3	8_19	6 - FAM
D21S11	21q11.2-q21	24, 24.2, 25-28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36-38	
D7S820	7q11.21-22	6_15	
CSF1P0	5q33.3-34	6_15	
D3S1358	3p	12_19	VIC
TH01	11p15.5	4-9, 9.3, 10, 11, 13.3	
D13S317	13q22-31	8_15	
D16S539	16q24-qter	5, 8_15	
vWA	12q 12-pter	11_24	NED
TPOX	2q23-2per	6_13	
D18S51	18q21.3	7, 9, 10, 10.2, 11-13, 13.2, 14, 14.2, 15-27	
Amelogenin	X: p22.1-22.3Y: p11.2	X-Y	
D5S818	5q21-31	7_16	PET
FGA	4q28	17-26, 26.2, 27-30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2	

Tablo AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplification Kit User's Manuel 2011 (Applied Biosystems)'den alınmıştır.

2.2.3.1. Adli Bilimlerde Kullanılan CODIS STR Lokuslarını İçeren Multipleks PCR Ticari Kitleri

AmpFISTR® Identifier® PCR Amplification Kit



Şekil 4. AmpFISTR® Identifier PCR Amplification Kit (Applied Biosystems)



Şekil 5. PowerPlex® 16 System Kit (Promega)



Şekil 6. Investigater IDplex Kit(Qiagen)

2.2.4. Klasik STR Lokuslarından MiniSTR Lokuslarının Oluşturulması

Toplu felaketlerde kişilerin kimliklendirilmesinde ve kriminal olaylarda olay yerinde bulunan biyolojik örneklerin kimliklendirilmesinde kullanılan DNA, genellikle eser miktarda ve degrade durumdadır. Rutinde kullanılan klasik 13 STR lokusu ile kimliklendirilme yapmak her zaman mümkün olmamaktadır. Çünkü DNA'nın çeşitli etkenlere maruz kalması sonucunda bakteriyal, biyokimyasal veya oksidatif reaksiyonlar sonucunda DNA parçalanır. Söz konusu lokusların DNA üzerinde kapladıkları alan büyük (size) olduğundan degradasyondan çabuk etkilenmektedirler.

Ayrıca bu büyük boyuttaki lokusların içinde insersiyon/ delesyon gibi mutasyonlar meydana gelebilir. Bu durumda; PCR'da primerler yanlış eşleşir ve sonuçta alel düşmesi (allelük droup out) ya da yanlış heterozigotluk gözlenebilir (Butler J. M. ve ark. 2003) (Butler J. M. 2007).

Yine kitlesel ölümlerde ve çeşitli afetlerde akrabalık (nesep) yoluyla kimliği belirlenemeyen kişilerin tayininde ve babalık-annelik tayini yapılırken ebeveynlerden (anne-baba) birinin olmadığı durumlarda kullanılan klasik STR lokusları yetersiz kalmaktadır. Dolayısıyla bu STR lokuslarına ek olarak lokusların araştırılması şart olmuştur (Coble M. D. ve ark. 2005).

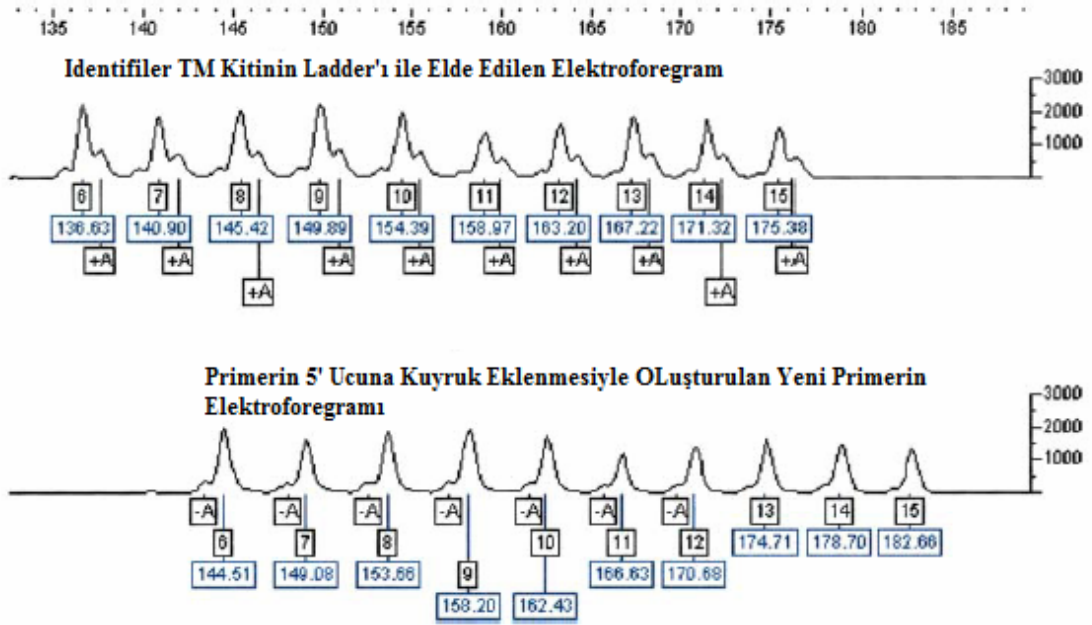
Yukarıda anlatılan nedenlerden dolayı, yeni STR lokusları oluşturmak ve mevcut lokusların PCR ürün boylarını (amplikon uzunluklarını) küçültmek için çalışmalar başlatılmıştır. Yeni lokuslar oluşturulurken, eser miktarda örneklerde kullanılması amacıyla PCR ürünlerinin daha küçük olmasına önem verilmiştir. Yeni mini STR lokusları oluşturulurken: Genomdaki konumu, polimorfik gücü ve alel uzunluğu temel alınarak primer dizaynı yapılmıştır (Butler J. M. 2007).

Klasik STR lokuslarını (13 CODIS + Penta D, Penta E ve D2S1338) küçültmek için primer dizaynları oluşturulurken Primer3 adı verilen bilgisayar programı kullanılmıştır. Bu program; minimum - maksimum primer uzunluğu, Tm sıcaklığı ve PCR ürün boyutu gibi parametreleri kolaylıkla oluşturmaktadır. Programa mümkün olduğunca yan

diziler temizlenerek, sadece tekrar bölgelerini içeren diziler girilmiştir. Ancak bazı lokuslar; tek nükleotitlik tekrar dizilerinin, polimorfik nükleotitlerin ve insersiyon/delesyona uğramış bölgelerin yer aldığı yan diziler içermektedir. Örneğin FGA lokusu ana tekrar dizisinden sonra çok sayıda 'T' tekrarı içermektedir. Bu nedenle lokusun primer dizaynı, ana tekrar bölgesinden 23 nükleotit sonra 'T' tekrarını da içerecek şekilde bitirilmiştir. D7S820 lokusunda ise aynı şekilde yer alan bu 'T' tekrarının varyasyon gösterdiği ve 8, 9 ya da 10 tekrar içerdiği, bu nedenle de bazı örneklerde alel düşmesi yaşandığı bilinmektedir. Bunu önlemek için, bu lokusun miniSTR primeri oluşturulurken ana tekrar bölgesinden sonra yer alan 'T' tekrarı primere dahil edilmemiştir. D8S1179 lokusunda ise ana tekrarın 55 baz gerisinde polimorfik nükleotit yer almaktadır ve bazı Asya Popülasyonu'na ait örneklerde Profiler Plus Kit (Promega) ile çalışırken alel düşmesi yaşandığı bildirilmiştir. Yine vWA lokusunun ana tekrarın 52 baz ilerisinde polimorfik nükleotit yer almakta ve alel düşmesi yaşanmaktadır. Bu nedenle bu lokusların miniSTR primerlerine polimorfik nükleotitler dahil edilmemiştir. Bir başka durum ise bazı popülasyonlarda, D13S317 lokusunda ana tekrarın 24 baz gerisinde, 4 bazlık delesyon olmasıdır. Bu 4 bazlık delesyondan dolayı Amerikan Afrikalı popülasyona ait örneklerde klasik STR kitleri ile çalışırken primerlerin yanlış bağlanması nedeniyle yanlış heterozigotluk görülmektedir. Aleller 10-12 olması gerekirken, 9-12 olarak görülmektedir. Bu nedenle söz konusu 4 bazlık delesyon bölgesi MiniSTR primerlerinin bağlanma noktası dışında bırakılmıştır.

Bu şekilde dizayn edilen miniSTR primerlerinin bazılarının geri (reverse) primerinde adenilasyon tam olarak sağlanamamıştır. Bu nedenle bu lokusların tekrar bölgelerinin geri (reverse) primerleri 7 baz uzayacak şekilde 5' ucuna 'GTTTCTT' kuyruğu eklenerek adenilasyonun gerçekleşmesi sağlanmıştır (Şekil 7) (Tablo 2).

Sonuç olarak adli laboratuvarlarda rutinde kullanılan ve CODIS'de içine yer alan 16 STR (13 CODIS + Penta D, Penta E, D2S1338) lokusunun primerleri yeniden dizayn edilerek ampikon uzunlukları küçültülmüştür. Bu şekilde klasik STR lokusları, miniSTR lokusları haline getirilmiştir (Butler J. M. ve ark. 2003) (Tablo 2).



Şekil 7: D7S820 lokusu primerinin 5' ucuna GTTTCTT kuyruğu eklenmesiyle oluşturulan miniSTR'ye ait elektrofogram

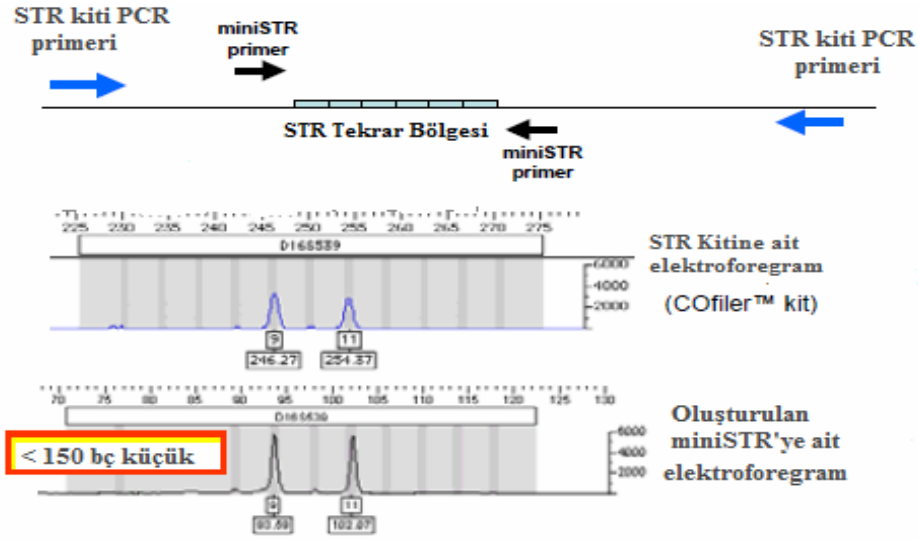
MiniSTR haline gelen bu 16 STR lokusunun (13 CODIS + Penta D, Penta E, D2S1338) PCR ürün boyutları 25 – 299 bç küçülmüştür (Tablo 2 ve Tablo3). Elde edilen piklerde gözle görülür iyileşme meydana gelmiştir (şekil 8). Daha önce PCR ürün boyutu 100 – 450 bç olan klasik STR'ler ile degrade örneklerde kimliklendirme yapılamazken, PCR ürün boyutu 51 – 281 bç olan miniSTR'ler ile kimliklendirme mümkün hale gelmiştir.

Tablo 2. 16 STR lokusunun küçültülmesiyle oluşturulan miniSTR primer dizisi (Butler J. M. ve ark. 2003)

Lokus		miniSTR Primer Dizisi (5' - 3')	Tm (°C)	5' Uca Eklenen Kuyruk	Tekrar Bölgesine Uzaklık (bç)
CSF1PO	F	VIC-ACAGTAACTGCCTTCATAGATAG	52.4		14
	R	GTGTCAGACCCTGTTCTAAGTA	53.6		6
FGA	F	6FAM-AAATAAAATTAGGCATATTACAAGC	55.9		3
	R	GCTGAGTGATTGTCTGTAATTG	56.6		23
TH01	F	6FAM-CCTGTTCTCCCTTATTCC	61.0		0
	R	GGGAACACAGACTCCATGGTG	62.8	GTTTCTT	1
TPOX	F	NED-CTTAGGGAACCCTCACTGAATG	60.0		-4
	R	GTCCTTGTCAGCGTTTATTTC	61.0	GTTTCTT	5
vWA	F	6FAM-AATAATCAGTATGTGACTTGGATTGA	58.1		0
	R	ATAGGATGGATGGATAGATGGA	57.3		0
D3S1358	F	NED-CAGAGCAAGACCCTGTCTCAT	59.5		-1
	R	TCAACAGAGGCTTGCATGTAT	58.4		-1
D5S818	F	6FAM-GGGTGATTTTCCCTTTGGT	58.0		4
	R	AACATTTGTATCTTTATCTGTATCCTTATTIAT	58.3		-5
D7S820	F	NED-GAACACTTGTATAGTTTAGAACGAAC	58.9		4
	R	TCATTGACAGAAATTGCACCA	58.6	GTTTCTT	65
D8S1179	F	VIC-TTGTATTTCATGTGTACATTTCGTATC	58.5		-4
	R	ACCTATCCTGTAGATTATTTTCACTGTG	59.4		5
D13S317	F	NED-TCTGACCCATCTAACGCCTA	58.3		19
	R	CAGACAGAAAGATAGATAGATGATTGA	57.4	GTTTCTT	2
D16S539	F	NED-ATACAGACAGACAGACAGGTG	52.5		0
	R	GCATGTATCTATCATCCATCTCT	55.0		16
D18S51	F	VIC-TGAGTGACAAATTGAGACCTT	54.8		5
	R	GTCCTACAATAACAGTTGCTACTATT	52.7		33
D21S11	F	VIC-ATTCCCCAAGTGAATTGC	55.8		2
	R	GGTAGATAGACTGGATAGATAGACGA	56.5		0
Penta D	F	6FAM-GAGCAAGACACCATCTCAAGAA	59.5		11
	R	GAAATTTACATTTATGTTTATGATTCTCT	57.3		19
Penta E	F	VIC-GGCGACTGAGCAAGACTC	57.1		6
	R	GGTTATTAATTGAGAAAACCTTACA	57.6		4
D2S1338	F	NED-TGGAAACAGAAATGGCTTGG	61.0		3
	R	GATTGCAGGAGGGAAGGAAG	61.1		3

Tablo 3. 16 STR lokusunun miniSTR haline getirilmesiyle yeni primer ile oluşan PCR ürün boyutları (Butler J. M. ve ark. 2003).

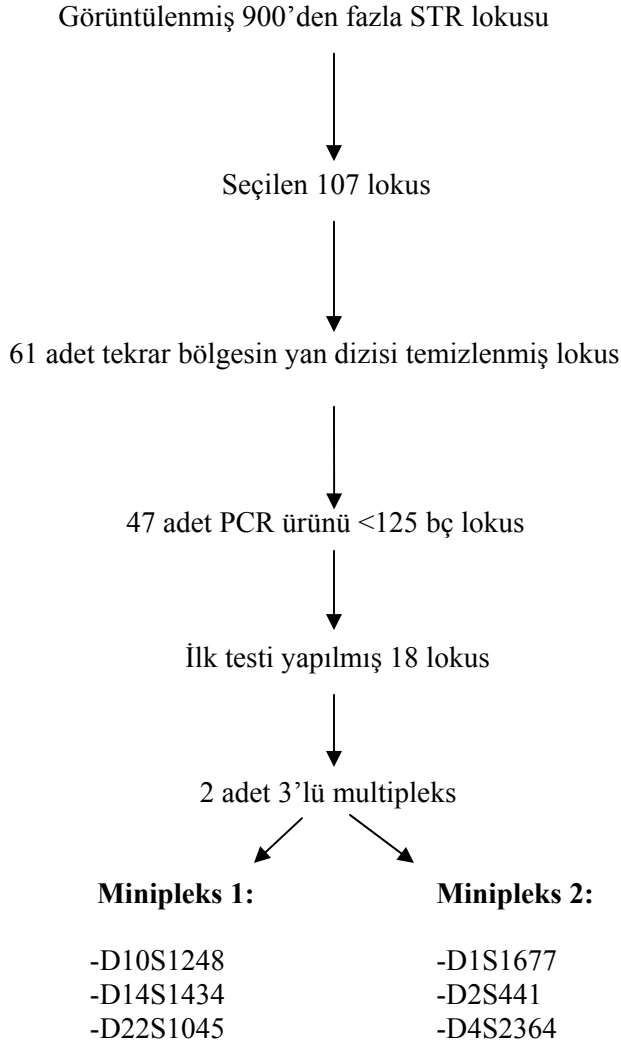
STR Lokusu	Gen Bankası Kodu	Gen Bankası Aleli	Alel Aralığı	Alellerin Dağılımı (bç)	STR Kitlerindeki Ürün Boyutu (size)	Oluşturulan miniSTR Ürün Boyutu (size)	Çıkarılan Size
CSF1PO	X14720	12	6-16	40 bç	280-320 bç (Cofiler)	89-129 bç	191 bç
FGA	M64982	21	12,2-51,2	156 bç	196-352 bç (ProPlus)	125-281 bç	71 bç
TH01	D00269	9	3-14	44 bç	160-204 bç (Cofiler)	51-98 bç	105 bç
TPOX	M68651	11	5-14	36 bç	213-249 bç (Cofiler)	65-101 bç	148 bç
vWA	M25858	18	10-25	60 bç	152-212 bç (ProPlus)	88-148 bç	64 bç
D3S1358	NT_005997	18	8-20	48 bç	97-145 bç (ProPlus)	72-120 bç	25 bç
D5S818	AC008512	11	7-16	36 bç	134-170 bç (ProPlus)	81-117 bç	53 bç
D7S820	AC004848	13	5-15	40 bç	253-293 bç (ProPlus)	136-176 bç	117 bç
D8S1179	AF216671	13	7-19	48 bç	123-171 bç (ProPlus)	86-134 bç	37 bç
D13S317	AL353628	11	5-16	44 bç	193-237 bç (ProPlus)	88-132 bç	105 bç
D16S539	AC024591	11	5-15	40 bç	233-273 bç (Cofiler)	81-121 bç	152 bç
D18S51	AP001534	18	7-27	80 bç	264-344 bç (ProPlus)	113-193 bç	151 bç
D21S11	AP000433	29	24-38,2	58 bç	186-244 bç (ProPlus)	153-211 bç	33bç
Penta D	AP001752	13	2,2-17	73 bç	376-449 bç (PP16)	94-167 bç	282bç
Penta E	AC027004	5	5-24	95 bç	379-474 bç (PP16)	80-175 bç	299bç
D2S1338	AC010136	20	15-28	52 bç	288-340 bç (SGM Plus)	90-142 bç	198 bç



Şekil 8. D16S539 lokusunun klasik STR kiti kullanarak ve miniSTR haline gelmesiyle elde edilen elektroforegram karşılaştırması (Butler J. M. 2005).

2.2.4.1. Yeni miniSTR'lerin Oluşturulma Basamakları

Klasik STR lokuslarının (CODIS) yetersiz kaldığı durumlarda (kitlesel ölümler gibi) bu lokuslara ek olacak yeni STR lokus araştırmaları da başlatılmıştır. Bu lokusları belirlemek için bir basamak zinciri kullanılmıştır. Bunun için daha önceden görüntülenmiş 900 STR lokusu içinden 107 tanesi seçilmiş. Bunların içinden yan dizileri temizlenmiş yani minileştirilmiş 61 adet lokusun 47 tanesinin PCR ürününün 125 bç'den küçük olduğu tespit edilmiş. Bu lokuslardan 18 tanesinin ilk testleri ve denemeleri yapılmıştır. Bunun içinden seçilen en küçük boyuttaki (size <125 bç) 6 tanesi, 2 adet 3'lü multipleks (Minipleks 1: D10S1248, D12S1434, D22S1045 Minipleks 2: D1S1677, D2S441, D4S2364) oluşturacak şekilde tasarlanmıştır (Şekil 9) (Coble M.D. ve ark. 2005).



Şekil 9. Yeni mini STR oluşturma basamakları (Coble M.D. ve ark. 2005)

2.2.5. CODIS Dışı Yeni Mini STR Lokusları

Son dönemde yapılan çalışmalarda CODIS içerisinde yer almayan, National Institute of Standards and Technology (NIST) tarafından 26 yeni miniSTR lokusu geliştirilmiştir. Seçilen 26 bölge, 13 CODIS lokusu ile aynı kromozom üzerindeyse en az ~50 Mb uzaklıkta ya da farklı kromozomlar üzerinde bulunan bölgelerdir. Bu yeni 26 STR lokusu “mini STR” olarak adlandırılmaktadır. Bu lokusların PCR ürünleri 150 bç'den küçüktür. “Alelik ladder” ları (her bir STR lokusuna ait tüm alelleri içeren DNA- alel cetveli) oluşturulmuştur (Hill C.R. ve ark. 2006). MiniSTR lokuslarının CODIS

lokuslarına göre daha küçük olması, dolayısıyla PCR ürünlerinin de küçük olması ve olay yerinden gelmiş, ileri derecede bozulmuş biyolojik örneklerin (100 pg DNA) tiplendirilmesine imkân vermesinden dolayı kriminal araştırmalarda alternatif lokuslar olarak kullanılmaya başlanmıştır.

26 yeni miniSTR, D1GATA113E02, D1S1627, D1S1677, D2S441, D2S1776, D3S3053, D3S4529, D4S2364, D4S2408, D5S2500, D6S474, D6S1017, D8S1115, D9S1122, D9S2157, D10S1248, D10S1435, D11S4463, D12ATA63A05, D14S1434, D17S974, D17S1301, D18S853, D20S482, D20S1082 ve D22S1045 lokuslarından oluşmaktadır (Hill C.R. ve ark. 2006).

Tablo 4. 26 yeni miniSTR lokusunun özellikleri

Lokus Adı	Gen Bankası (tekrar#)	Kromozom Pozisyonu*	Kromozom Bölgesi	Alel Büyüküğü (bç)	Alel Aralığı	Tekrar Ünitesi
D1GATA113	Z97987 (11)	1.kr. 7.377 Mb	1p36.23	81_105	7_13	GATA
D1S1627	AC093119(13)	1.kr. 106.676 Mb	1p21.1	81_100	10_16	ATT
D1S1677 (NC02)	AL513307 (15)	1.kr. 160.747 Mb	1q23.3	81_117	9_18	TTCC
D2S441 (NC02)	AC079112 (12)	2.kr. 68.214 Mb	2p14	78_110	9_17	TCTA
D2S1776	AC009475 (11)	2.kr. 169.471 Mb	2q24.3	127_161	7_15	AGAT
D3S3053	AC069259 (9)	3.kr. 173.234 Mb	3q26.31	84_108	7_13	GATA
D3S4529	AC117452 (13)	3.kr. 85.935 Mb	3p12.1	11_139	13_20	GATA
D4S2364 (NC02)	AC022317 (9)	4.kr. 93.976 Mb	4q22.3	67_83	8_12	GAAT
D4S2408	AC110763 (9)	4.kr. 30.981 Mb	4p15.1	85_109	7_13	ATCT
D5S2500	AC008791 (17)	5.kr. 58.735 Mb	5q11.2	85_126	14_24	GATT[GATA]
D6S474	AL357514 (17)	6.kr. 112.986 Mb	6q21	107_136	10_17	[AGAT] GATA
D6S1017	AL035588 (10)	6.kr. 41.785 Mb	6p21.1	81_110	6_13	ATCC
D8S1115	AC090739 (9)	8.kr. 42.656 Mb	8p11.21	63_96	9_20	ATT
D9S1122	AL161789 (12)	9.kr. 76.918 Mb	9q21.2	93_125	9_17	TAGA
D9S2157	AL162417 (10)	9.kr. 133.065Mb	9q34.2	71_107	7_19	ATA
D10S1248 (NC01)	AL391869 (13)	10.kr. 130.567Mb	10q26.3	79_123	8_19	GGAA
D10S1435	AL 354747(11)	10.kr. 2.233 Mb	10p15.3	82_139	5_19	TATC
D11S4463	AP002806 (14)	11.kr. 130.338Mb	11q25	88_116	10_17	TATC
D12ATA63	AC009771 (13)	12.kr. 106.825 Mb	12q23.3	76_106	9_19	ATA
D14S1434 (NC01)	AL121612 (13)	14.kr. 93.298 Mb	14q32.13	70_98	13_20	GATA[GACA]
D17S974	AC034303 (10)	17.kr. 10.459 Mb	17p13.1	95_124	5_12	CTAT
D17S1301	AC016888 (12)	17.kr. 70.193 Mb	17q25.1	114_139	9_15	AGAT
D18S853	AP005130 (11)	18.kr. 3.981 Mb	18p11.31	82_104	9_16	ATA
D20S482	AL121781 (14)	20.kr. 4.454 Mb	20p13	85_126	9_19	AGAT
D20S1082	AL158015 (14)	20.kr. 53.299 Mb	20q13.2	73_101	8_17	ATA
D22S1045 (NC01)	AL022314 (17)	22.kr. 35.779 Mb	22q12.3	82_115	8_19	ATT

Tablo (Hill C.R. ve ark. 2006-A'dan alınmıştır)

*Bu sütundaki bilgiler, lokusların kaçınıcı kromozomda (ör: 1.kr.) ve bu kromozom üzerinde bulunduğu Mb (mega baz) noktasını (ör: 7.377 Mb) göstermektedir.

1. KROMOZOM (249.3 Mbç)



Şekil 10. Lokusların kromozom üzerindeki pozisyonları

Özellikle 6 lokusun çeşitli popülasyonlarda validasyonu ve optimizasyonu yapılmıştır. Bu 6 lokusun (D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441, D1S1677) PCR ürünleri 125 bp'den küçüktür. Bu lokuslardan D10S1248, D2S441 ve D22S1045 Avrupa'daki adli laboratuarlarda kişi identifikasyonunda kullanılan STR 'lere eklenmiştir (Coble M.D. ve ark. 2005) (Hill C.R. ve ark. 2006).

2010 ve 2011 yıllarında bu lokuslardan D10S1248, D2S441 ve D22S1045 lokusları ticari multpleks kitlelere (Investigator Human Identification PCR Kit grubunun birkaç çeşidine (QIAGEN®), PowerPlex® 16 System Kit'e (Promega) ve AmpFℓSTR® NGM™ PCR Amplification Kit'e (Applied Biosystems) eklenmiştir.

2.2.6. Yeni Mini STR Lokuslarının Primer Dizaynları

Coble M. D. ve ark. tarafından 2005'te oluşturulan primerlerin Tm değeri 57- 63 °C olup optimum sıcaklıkları 60 °C'dir. Primerler en az 18 nükleotitlik bazlardan oluşmaktadır. GC oranları % 20 – 80 arasındadır. PCR ürünlerinin boyutu mümkün olan en küçük boyutta dizayn edilmiştir. Primerler floresan boyalarla işaretlenmiştir (Coble M.D. ve ark. 2005)

Tablo 5. Yeni miniSTR lokuslarının primer özellikleri (Coble M.D. 2005'ten alınmıştır)

Lokusun Adı	Primer Dizini (5' - 3')	Primer Konsantrasyonu (µm)	Primerin STR Bölgesine olan Uzaklığı	Per Ürünü (Amplicon) Boyutu
D1S1677	İleri [NED]-TTCTGTGGTATAGAGCAGTGT Geri *GTGACAGGAAGGACGGAATG	1.3 1.3	0 0	103
D2S441	İleri [VIC]-CTGTGGCTCATCTATGAAACTT Geri *GAAGTGGCTGTGGTGTATGAT	0.7 0.7	0	92
D4S2364	İleri [FAM]-CTAGGAGATCATGTGGGTATGATT Geri *GCAGTGAATAAATGAACGAATGGA	1.1 1.1	2 -7**	78
D10S1248	İleri [FAM]-TTAATGAATTGAACAAATGAGTGAG Geri *GCAACTCTGGTTGATTGTCTTCAT	1.3 1.3	1 0	102
D14S1434	İleri [VIC]-TGTAATAACTCTACGACTGTCTGTCTG Geri *GAATAGGAGGTGGATGGATGG	1.3 1.3	- 11** 0	88
D22S1045	İleri [NED]-ATTTTCCCCGATGATAGTAGTCT Geri *GC GAATGTATGATTGGCAATATTTT	0.8 0.8	3 6	105

*Koyu renkte yazılmış olan Guanin her geri primerin 5' ucuna eklenmiştir.

** Negatif sayı, primerin 3' ucunun sonundaki tekrar bölgesini ifade eder.

2.3. Biyolojik Deliller ve DNA Kaynakları

Son 20 yılda ceza soruşturmalarında fiziksel delillerin önemi giderek artmıştır. Mahkemelerdeki görgü tanıklarının ifadeleri güvenilir ve önyargılı bulunurken fiziksel deliller daha somut nitelikler olarak karşımıza çıkmaktadır. Fiziksel delillerin bir alt grubu olan biyolojik deliller, DNA'nın keşfedilmesiyle en önemli delil haline gelmiştir. Çünkü DNA ile bu biyolojik kalıntının kimliklendirilmesi mümkündür. Bu sebeple biyolojik deliller; suç, suçlu ve mağdur arasında bağ kuran en önemli delil haline gelmiştir. DNA'nın hücre çekirdeğinde yer almasından dolayı önceleri sadece

çekirdekli hücrelerden DNA elde edilebilirken, mitokondrial DNA'nın kullanılmasıyla birlikte her türlü biyolojik örnekten kimliklendirme yapmak mümkün hale gelmiştir.

Olay yerinde en sık rastlanan delillerin başında kan ve kan lekeleri gelmekle beraber olay yerinin türüne göre; kemik, semen, seminal sıvı, doku, organ, diş, kıl, tırnak, tükürük, idrar, gaita, epitel hücre ve diğer biyolojik sıvılara da rastlanabilir. Çevresel koşullara bağlı olarak biyolojik delillerin içerdiği DNA miktarı değişiklik göstermektedir (Tablo 5) (Lee H.C. ve Ladd C. 2001) (Saferstain R. 2001 - A) (Weedn V. W. ve ark. 1998).

Tablo 6. Çeşitli biyolojik delillerin içerdiği DNA miktarı (Lee H.C. ve Ladd C. 2001'den alınmıştır)

Biyolojik Delil	İçerdiği DNA Miktarı
Sıvı kan	20.000 – 40.000 ng/mL
Kurumuş kan	250-500 ng/cm ²
Sıvı semen	150.000– 300.000 ng/mL
Cinsel ilişki sonrası alınmış vajinal svab	10 – 3.000 ng/svab
Koparılmış köklü kıl	1 – 750 ng/kök
Dökülmüş köklü kıl	1 – 10 ng/kök
Sıvı tükürük	1.000 – 10.000 ng/mL
Ağız içi svab	100 – 1500 ng/svab
İdrar	1 – 20 ng/mL
Kemik	3 – 10 ng/mg
Doku	50 – 500 ng/mg

2.3.1. Olay Yerindeki Biyolojik Delillerinin Toplanması ve Saklanması

Kriminal araştırmaların başarılı bir şekilde sonuçlanması için fiziksel delillerin toplanması ve saklanması ilk ve en önemli adımdır. O. J. Simpson gibi birçok ünlü davada görüldüğü gibi; delil toplama kriterlerine uyulmadığı için, delil ya 'hukuka aykırı delil' kapsamına girmiş ya da toplanma sırasındaki aksilikler nedeniyle delil olma niteliğini kaybetmiştir. Avrupa'da mahkemelerde DNA analizlerine yapılan itirazların çoğu, biyolojik materyalin toplanması ve saklanması sırasında yapılan hatalar ile ilgilidir. Biyolojik delilin toplanması ve saklanması süreci (delil toplama zinciri), hem

bilimsel hem de yasal açıdan davanın değerlendirilmesinde çok önemlidir. Bu süreç: Delilin belgelenmesi, toplanması ve saklanması, laboratuara iletilmesi ve analizi basamaklarından oluşur (Lee H.C. ve Ladd C. 2001).

Delilin Belgelenmesi:

- Delile dokunmadan ve toplamadan, delilin farklı açılardan fotoğrafı çekilmelidir.
- Delilin olay yerindeki diğer delillerle olan ilişkisi, pozisyonu ve konumu kayıt altına alınmalıdır.
- Her delile delil numarası verilmelidir.
- Delil paketi etiketlenmeli, etikete delil adı toplandığı yer, tarih, saat ve toplayan kişinin adı yazılarak imzalanmalı ve mühürlenmelidir.

Delilin Toplanması ve Saklanması:

- Kanla taşınan patojenler olabileceğinden, hem çapraz kontaminasyonu önlemek hem de delil toplayan kişinin kendisini olası enfeksiyona karşı koruması için; eldiven, maske, bone ve tek kullanımlık önlük kullanmalıdır.
- Delilin özelliğine göre tek kullanımlık steril aletler ile delil toplanmalıdır.
- Islak olan biyolojik delil kurutulduktan sonra kâğıt zarflarda muhafaza edilmelidir.
- Delil toplama esnasında yemek ve içmekten sakınılmalıdır.
- Toplanan biyolojik deliller +4 °C'de muhafaza edilip en kısa sürede laboratuara ulaştırılmalıdır.

Delilin Laboratuara Teslimi ve Laboratuvar süreci:

- Gelen delil kabul edilmeden önce paketin açık olup olmadığı, mühür, etiket bilgileri (tarih, toplayanın adı, örnek adı) kontrol edilmelidir.
- Delilin tarifinin ve etiket bilgilerinin uygun olup olmadığı kontrol edilmelidir.
- Tüm delil verileri kabul edildiğinde Delile ait laboratuvar kodu verilmelidir ve ilgili yere kaydı yapılmalıdır.

- Deliller, kontaminasyonu önlemek için temiz bir ortamda açılmalıdır. Delili açan kişilerin bone, maske, eldiven ve tek kullanımlık önlük giymesi ve sık sık eldiven değiştirmesi gerekir.
- Delille ilgili bir tutanak tutulmalıdır. Bu tutanakta delilin ayrıntılı tanımı (Boyutu, rengi, çeşidi, miktarı vb.) yapılmalıdır.
- Delile uygun analiz metodları seçilmelidir. Bu analiz kalite standartlarına uygun yapılmalıdır (Lee H.C. ve Ladd C. 2001).

2.3.2. Kan ve Kan Lekelerinin Toplanması Sırasında Yapılması Gerekenler

Adli olayların aydınlatılmasında lekelerin önemi büyüktür. Çünkü olay yerinden toplanan ve incelemeye gönderilen materyalin büyük bir kısmını kan lekeleri oluşturmaktadır. Bu lekelerin toplanması kurallara uygun bir şekilde yapılmalıdır. (Weedn V.W. ve ark. 1998).

Olay yerinden elde edilen sıvı kan steril bir enjektör ya da mikro pipet yardımı ile steril bir tüpe alınmalıdır. Eğer bir kan pıhtısı varsa, steril bir spatül ile tüpe aktarılabilir. Ya da steril pamuklu kumaşa veya filtre kağıdına emdirilerek leke oluşturulabilir. Ancak emdirilen kan örneği paketlenmeden önce kurutulmalıdır.

Islak kan lekeli giysiler temiz bir ortamda direk güneş görmeyecek şekilde bir odada kurutulup paketlenmelidir. Islakken hava geçirmeyen, plastik bir malzeme içine konursa kan bozulur. Bu nedenle kuruyan giysiler kâğıt malzeme kullanılarak paketlenmelidir.

Büyük ve taşınmaz objelerdeki kurumuş kan lekeleri temiz bir kâğıt üzerine kazınabilir, özel yapışkan bir bant kullanılarak alınabilir, nemli steril beze ya da svaba emdirilebilir. Diğer bir alternatif yol, kan lekesine birkaç damla su damlatılır ve pipet yardımıyla temiz tüpe aktarılır.

Ceset üzerindeki kan lekeleri, cesedin deri hücrelerini almamak için nazikçe alınmalıdır. Cesedin tırnak altındaki kan bir kürdanla kazınmalı, aynı zamanda steril bir tırnak makasıyla da tırnak kesilip uygun kaba alınmalıdır (Saferstain R. 2001 - B).

2.3.3. Biyolojik Örnekten DNA Analizini Engelleyen Faktörler

Bir biyolojik materyalden DNA elde etmemizi engelleyen faktörler; materyalin miktarı, saflığı ve bozunma derecesidir.

Olay yerinden elde edilen deliller, gerek buldukları koşullar gerekse taşınma sırasındaki zorluklar nedeniyle korunması güç örneklerdir. Biyolojik delillerin doğru bir şekilde toplanması için; mümkünse yeterli miktarda örnek alınmalıdır. Delil olabildiğince ortamdaki kir ve diğer unsurlardan arınmış olarak toplanmalıdır. Deliller toplandıktan hemen sonra adli laboratuara soğuk ve kuru ortamda muhafaza edilerek götürülmelidir (Lee H.C. ve Ladd C. 2001).

2.3.4. Olay Yerinden Gelen Biyolojik Örneklerin Bozulma Nedenleri

DNA içeren her türlü fiziksel delil (kan, semen, deri hücreleri, yumuşak doku, kemik, diş, saç, tükürük, mukus, tırnak, idrar, dışkı v.b) biyolojik delildir. Birçok olay yerinde, çok çeşitli biyolojik delil bulmak mümkündür. Genel olarak; tecavüzlerde ve cinayetlerin % 60'ında kan, soygunların % 10'unda ve hırsızlıklarının % 6'sında saç bulunmaktadır.

Biyolojik deliller; olay yerinde doğrudan bulunabileceği gibi, başka nesnelere üzerinde de bulunabilir. Sakız, sigara izmariti, zarf, pul ya da bardak üzerinde bulunabilen tükürük; tırnak içlerinde bulunabilen doku artıkları; giysiler üzerinde bulunabilen kıllar, giysi, koltuk, halı vb. her türlü eşyada bulunabilen kan ya da semen lekeleri buna örnek olarak verilebilir. Biyolojik delilleri bozan en önemli etkenler kontaminasyon ve degradasyondur (Weedn V.W. ve ark. 1998).

2.3.4.1. Kontaminasyon (Bulaşma)

Delil dışındaki herhangi bir maddenin delile karışması, kontaminasyon (bulaşma) adını alır. Bitki, hayvan, bakteri ve mantar gibi organizmaların bulaşmış olduğu deliller DNA analizini olumsuz yönde etkilemez. Çünkü adli amaçlı kullanılan DNA lokusları insana özgüdür. Ancak DNA'ya zarar veren enzimleri üreten mikroorganizmalar, insan DNA'sının degradasyonuna sebep olacağı için, DNA analiz sonuçlarını negatif yönde etkiler. Özellikle olay yerinden gelen biyolojik örneklerin hangi koşullara maruz kaldığı bilinmeyebilir. Olay yerine özgü olarak çok çeşitli durumlar söz konusu olabilir. Bu nedenle kontaminasyon ve degradasyon STR tiplemesinde rastlanan en büyük sorunlardan biridir (AmpFISTR İdentiler PCR Amplification Kit, User's Manuel 2001) (Rudin N. ve ark. 2002).

2.3.4.1.1. Kontaminasyonun Nedenleri

Delil niteliği taşıyan bir biyolojik materyal aşağıda anlatıldığı şekilde kontamine olabilir (Lygo J.E. ve ark. 1994).

- *Olay yerinde bulunan ve genomik DNA içeren delillerin toplanması sırasında:* Farklı biyolojik materyallerin usulüne uygun toplanmaması nedeni ile birbirine bulaşması (çapraz kontaminasyon). Olay yerinde bulunan kişilerin gerekli önlemleri almaması veya özeni göstermemesi nedeniyle kendi DNA'ları ile delili kontamine etmeleri.
- *Laboratuvar çalışmaları sırasında oluşabilecek kontaminasyonlar:* Laboratuvar da biyolojik materyalin analize hazırlanması ve/veya analizi sırasında örneklerin birbirleriyle kontaminasyonu. Laboratuvar personelinin kendi DNA'sı ile biyolojik materyali kontamine etmesi. Bir önceki PCR işlemi sırasında amplifiye olan DNA'nın bir sonraki örneğe bulaşması.

Kontaminasyonun ilk kaynağı genellikle olay yeridir. Olay yerinde meydana gelen kontaminasyonun kontrolü ve engellenmesi zordur. Ancak, laboratuvar kaynaklı kontaminasyon, uygun laboratuvar prosedürleri ve kuralları uygulandığı takdirde kontrol edilebilir. Bunun için, DNA'nın izolasyonundan PCR işlemine kadar olan tüm

aşamalarda, kullanılan tüplerin ve kimyasal malzemelerin test edilmesi amacı ile negatif kontroller kullanılmalıdır. Eğer negatif kontrolde herhangi bir DNA profiline rastlanırsa, kontaminasyonun kaynağı tespit edilip yok edilmelidir. Bazı araştırmacılar, PCR işlemi sırasında oluşabilecek kontaminasyonun 4 genel nedenini incelemiştir. Bunlar; PCR hazırlanmasında, PCR ürünleri, laboratuvar havalandırması ve DNA'nın saklanması sırasında oluşabilecek kontaminasyonlardır. Araştırmalar, PCR kontaminasyonlarının, basit bir dikkatsizlik sonucu olmadığını, kontaminasyonu engelleyen temel kural ve prosedürlerden genel bir sapma sonucunda meydana geldiğini göstermektedir (Scherczinger C.A. ve ark. 1999).

Laboratuvar personelinden kaynaklanan kontaminasyonun yanında, DNA analizi sırasında kullanılan malzemelerden (tüp, pipet uçları v.b) kaynaklanan kontaminasyon (sporadik kontaminasyon) bir diğer sorundur. Forensic Science Service (FSS)'in yaptığı bir araştırmada, amplifikasyonun gerçekleştirildiği PCR tüplerinin, DNA kontaminasyonuna neden olabileceğini, PCR tüplerine negatif kontrol ve kalite kontrol testleri yaparak göstermişlerdir.

Kontaminasyon üzerine yapılan araştırmalar; personel kaynaklı kontaminasyonun tespit edilmesinde, laboratuvar personeline ait DNA verilerinin oluşturulmasının etkili bir yöntem olduğunu göstermektedir. Oluşturulan bu veriler, sıklıkla, PCR sonucu elde edilen DNA profilinin delilden ya da laboratuvar personelinden kaynaklandığının anlaşılmasında kullanılır (Howitt T. ve ark. 2003). Bunun dışında çapraz kontaminasyonun tespit edilmesi amacı ile bilgisayar programları geliştirilmiştir. Bu programa, çalışılan tüm genotipler kaydedilerek karşılaştırma yapmak ve çapraz kontaminasyonu tespit etmek mümkün olmaktadır (Butler J.M. 2005) (GeneMapper® *ID-X* Software Version 1.0, Getting Started Guide, 2007).

Ayrıca DNA analizinde otomatik robotların kullanılmaya başlanması ile laboratuvar personelinin örnekler ile direkt temasının azalmasından dolayı, kontaminasyon riski bu yönde azalmıştır (Butler J.M. 2005).

2.3.4.1.2. Kontaminasyonun DNA Sonuçlarına Etkisi

Peter Gill ve ark. kontaminasyonun DNA sonuçlarına etkilerini araştırmış ve buna göre:

- Kontaminasyon kaynağının tespiti DNA analizinin her aşamasında mutlaka negatif kontrolün kullanılması gerektiğini,
- PCR da kullanılan tüplerden de bulaşma olabileceğini, bunun için bir tüpte kontaminasyon bulunması durumunda o seriye ait tüplerin kullanılmaması gerektiğini,
- DNA izolasyonu, PCR öncesi hazırlık ve PCR işlemleri farklı alanlarda yapılması gerektiği,
- Kanıt DNA örneğinin kontamine olması durumunda, karışım DNA profili elde edildiği ve sonuçların bu durum göz önüne alınarak değerlendirilmesi gerektiği,
- Kontaminasyona neden olan DNA'nın, delilin DNA'sına göre çok az oranda amplifiye olduğu durumlarda, bunun göz ardı edilebileceği, bu durumun tersine, kontaminasyona sebep olan DNA, delilin DNA'sına göre daha fazla oranda amplifiye olmuşsa, delilin DNA profilini maskeleyebileceğini,
- Laboratuvar personeline ait DNA profil verilerinin tespit edilerek olgu profilleriyle karşılaştırılması gerektiği ve

Kontaminasyon, alınan tüm önlemlere rağmen tamamen engellenebilecek bir sorun olmadığını vurgulamışlardır (Gill P. ve ark. 2004).

Amerika Birleşik Devletlerinde, 'suçsuzluk projesi' adı altında bir proje başlatılmış ve hapiste bulunan insanların karıştığı suçlara ait deliller tekrar incelenmiştir. Adli DNA çalışmalarının ilk yıllarında kontaminasyonun önemi çok iyi bilinmiyordu ve delil toplanması sırasında eldiven kullanılmamaktaydı. Bunun sonucunda gerçek suçlunun DNA profili, delili toplayan görevlinin DNA profili tarafından maskelenebilmekte, yani, gerçek suçlu yerine, delili toplayan kişinin DNA'sı tespit edilmekteydi. Bu durumda suçlu belirlenmiyordu. Delilden DNA profili belirlenmediği için cezaevine girmesi gereken bir kişi, yanlış olarak masum ilan edilmekteydi. Bu senaryo, DNA'nın, araştırmanın bir parçası olduğunu, masum ya da suçlu ayırımında tek ve mutlak kanıt olmadığını düşünülmesine yol açmış ve DNA'ya olan güven sarsılmıştı (Butler J.M.

2005). Günümüzde, adli laboratuvarlarda kalite standartlarına uygun çalışılmasıyla kontaminasyon olasılığı azalmıştır.

2.3.4.2. Degredasyon (Bozunma)

DNA vücut dışında çeşitli çevresel koşullara maruz kaldığında, fizikokimyasal özellikleri değişebilir. Bu değişime sebep olan çevre şartları; zaman, sıcaklık, nem, ışık ve çeşitli kimyasallardır. Bu etkiler oksidatif veya hidrolitik DNA hasarına sebep olur. Oksidatif reaksiyonlar, DNA üzerinde birçok baz değişikliğine sebep olur. Bu da çoğalma sırasında primerlerin yanlış eşleşmesine ve DNA ipliğinin uzayamamasına neden olur. Bunun sonucunda DNA çoğalamaz. Hidrolitik reaksiyonlar ise; DNA üzerinde fosfodiester bağlarının kırılmasına ve DNA'nın parçalanmasına neden olur. Ayrıca β -N-glikozit bağlarının kırılması ya da deaminasyon ile bazların yanlış eşleşmesine sebep olur. Her iki durumda da DNA bozunur (parçalanır). Bu bozunma, belirli koşullara bağlı olarak hafif ya da şiddetli olabilir (Rudin N. ve ark. 2002) (Capelli C. ve ark. 2003) (Bender K. ve ark. 2004) (Wurmb-Schwark N. ve ark. 2004).

Bozunma sonucunda küçük boyuttaki alel sağlam kalırken, büyük boyuttaki alelin kaybına neden olur. Dolayısıyla heterozigot bir birey, homozigot olarak görülür. Adli analizde kullanılan STR lokuslarının hepsinde alel boyutları birbirine çok yakındır, dolayısıyla bozunmadan dolayı heterozigot alel çiftinden birinin kaybolması pek sık rastlanır bir durum değildir. Alel kaybı, sadece DNA miktarının az olduğu durumlarda pik yüksekliğinin (RFU değerinin) analiz eşliğinin altında ya da sınırında kaldığı durumlarda meydana gelir (Rudin N. ve ark. 2002).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. DNA Örnekleri

3.1.1. Taze Kan Örnekleri

Kan örnekleri, rızaları alınmış olan (Ek 1: Aydınlatılmış Onam Formu) 30 sağlıklı kişiden (İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü yüksek lisans öğrencileri) temin edilmiştir. Bu 30 kişinin, parmaklarından alınan kan örnekleri filtre kâğıdına emdirildi, kodlandı ve kurutularak ayrı ayrı zarflarda saklandı. Bekletilmeden DNA izolasyonu yapıldı.

3.1.2 Çeşitli Yüzeyler Üzerinde Bekletilmiş Kan Lekelerinin Oluşturulması

Rızası alınmış bir kişiden (Adli Tıp Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi) EDTA'lı tüpe kan alındı. Bu kan örneğinden 200'er µl, olay yerinde bulunabilecek çeşitli yüzeylere (kot, penye, havlu, döşeme, bıçak kabzası, laminant parke, kalebodur dolgusu-derz ve kapı kilit demiri) damlatıldı. Bu yüzeyler 1 hafta, 1 ay, 3 ay ve 6 ay laboratuvar ortamında, oda ısısında, temiz ve ağzı açık bir kutunun içinde bekletildi.

3.2. Kullanılan Kit ve Kimyasallar

İzolasyonda Kullanılan Kitler:

- QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIAamp® DNA Micro Kit (QIAGEN)

DNA Miktar Ölçümünde Kullanılan Kitler:

- Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen™)

PCR'da Kullanılan Kimyasallar ve Kitler:

4. Floresan (6FAM, HEX ve TET) ile işaretli primerler (Alpha DNA)
5. TopTaq™ Master Mix Kit (QIAGEN)

Elektroforezde Kullanılan Kimyasallar:

- Hi-Di™ formamide (Applied Biosystems),
- GeneScan™ - 350 TAMRA™ Size standard (Applied Biosystems)
- Flourescent Amidite Matrix Standart Kit for 310 system - DS-34 Matrix Standart (Applied Biosystems)

3.3. Kullanılan Cihazlar

- Mikrosantrifüj - ALC Multispeed - PK121
- Vorteks - Harmony Mixer Uzusio - VTX-3000L
- Termomikser - Wealtec Corp.
- Fluorometre cihazı - Qubit® (Invitrogen™)
- Isı döngü cihazı (PCR) - GeneAmp® 9700 (Applied Biosystems)
- Genetik Analizatör - ABI 310 (Applied Biosystems)

3.4. Metodun Uygulanması

Yukarıda yazılmış olan cihazlar, kit ve kimyasallar kullanılarak uygulanan metot şu aşamalardan oluşmaktadır:

- Kan ve kan lekelerinden DNA izolasyonu
- İzolatların DNA miktar tayini
- PCR aşaması
- PCR ürünlerinin elektroforezi
- Elektroforez sonrası 6 miniSTR lokusunun analizi ve tiplendirilmesi

3.4.1. Kan ve Kan Lekelerinden DNA İzolasyonu

Kan ve kan lekelerinden DNA izolasyonu QIAamp® DNA Mini Kit - QIAGEN® ile, bozunmuş örneklerin (kot, penye, havlu, döşeme, bıçak kabzası, laminant parke, kalebodur dolgusu-derz ve kapı kilit demiri) izolasyonu QIAamp® DNA Micro Kit - QIAGEN® ile yapıldı (QIAamp® DNA Mini Kit and QIAamp® and DNA Blood Mini

Kit Handbook (2001) (QIAamp® DNA Micro Handbook (2010). İzolasyon aşaması aşağıda verildiği gibidir:

3.4.1.1. QIAamp® DNA Mini Kit İle Kurumuş Kan Lekelerinden DNA İzolasyonu

4. Steril delgeç ile kurumuş kan lekesinden (filtre kâğıdı) 4 parça alarak 1,5µl'lik mikrosantrifüj tüpüne konuldu. Üzerine 180µl ATL tamponundan eklendi.
5. 10 dakika 85 °C'de inkübe edildi.
6. 20µl proteinaz K eklendi ve vortekslendi. 56°C'de 1 saat inkübe edildi.
7. 200µl AL tamponu eklendi ve vortekslendi. 70°C'de 10 dakika inkübe edildi.
8. 200µl % 96-100 saflıkta etanol eklendi ve vortekslendi.
9. Elde edilen karışım QIAamp® mini spin kolona aktarıldı. 8000 rpm'de 1 dak. santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı, temiz toplama tüpü takıldı.
10. 500µl AW1 tamponu eklendi. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü atılıp temizliğiyle değiştirildi.
11. 500µl AW2 tamponu eklendi. 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
12. QIAamp® mini spin kolon steril 1,5µl'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. 150µl AE tamponu eklendi. Oda ısısında 1-2 dakika inkübe edilerek 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

3.4.1.2. QIAamp® DNA Micro Kit İle Çeşitli Yüzeyler Üzerinde Bekletilmiş Kan Lekelerinden DNA İzolasyonu

Örneği lizis etmek için;

1. Kot, penye, havlu ve döşemedeki kan lekeleri: Lekeli materyalden 0,5 cm²'lik bir parça steril makas yardımıyla kesildi ve küçük parçalara ayrıldı. 2 ml'lik ependorf tüpe aktarıldı. Üzerine 180 µl ATL ve 20 µl Proteinaz K eklendi. 10 saniye vortekslendi.
2. Bıçak kabzası, laminant parke, kalebodur arası dolgu (derz) ve kapı kilit demirindeki kurumuş kan lekeleri: Steril svablar steril suyla nemlendirilerek kan lekeleri svablara emdirildi. Svabların kanı emen kısmı kesilerek 2 ml'lik ependorf tüpe aktarıldı. Üzerine 400 µl ATL ve 20 µl Proteinaz K eklendi. 10 saniye vortekslendi.

- Birinci adımda hazırlanan lizat 1 saat 56 °C'de 900 rpm hızda termomikserde çalkalanarak inkübe edildi (Havludaki kan lekeleri 24 saat süre ile inkübe edildi).
- Kısa bir süre santrifüj edildi.
- Ependorf tüpteki; kot, penye, havlu ve döşeme lekeleri üzerine 200 µl, kapı kilit demiri, bıçak kabzası, kalebodur arası dolgu ve laminant parke lekelerine 400 µl AL çözeltisinden eklendi ve 10 saniye vortekslendi.
- 10 dakika 70 °C'de 900 rpm hızda çalkalanarak (termomikserde) inkübe edildi
- 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- Bu aşamadan sonra svaba emdirilmiş olan kapı kilit demiri, bıçak kabzası, kalebodur arası dolgu ve laminant parke lekelerine 200 µl etanol (% 96-100) eklendi 15 sn vortekslendi ve 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Tüm karışımlar QIAamp® MinElute Kolon'a aktarıldı (altında toplama tüpü içeren). 8000 rpm'de 1 dak. santrifüj edildi ve toplama tüpü atılarak yenisiyle değiştirildi. Kolon tamamen boşalmamış ise yüksek hızda kolon boşalana kadar santrifüj edildi.
- Üzerine 500 µl AW1 eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Alttaki toplama tüpü atıldı, kolon temiz tüpe takıldı.
- Üzerine 500 µl AW2 eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Alttaki toplama tüpü atıldı, kolon temiz tüpe takıldı.
- Tekrar 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj yapıldı.
- Kolon 1,5 ml'lik ependorfa yerleştirildi. 20-50 µl AE eklenip 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı.

3.4.2. DNA Miktar Tayini

İzole edilen örneklerin DNA miktar tayini Qubit® Fluorometer - Invitrogen™ cihazında, Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen™) kullanılarak yapıldı (Qubit ssDNA Assay Kit Quick Reference Card, 2010). İşlem basamakları aşağıda verildiği gibidir:

3.4.2.1. The Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit ile DNA İzolatlarının Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

- 1) Ölçülecek örnek sayısı ve cihazın kalibrasyonu için gerekli 2 adet standart ile birlikte toplam sayı belirlenerek, 0,5 ml'lik steril tüpler hazırlandı.
- 2) Miktar tayin kitinin içeriğinde bulunan Quant-iT™ dsDNA HS reaktifi, ölçümü yapılacak her örnek için 200:1 oranında Quant-iT™ working çözeltisi ile seyreltildi. Tüplere bu çözeltiden 200 µl' lik karışımlar hazırlandı.
- 3) Hazırlanan karışımdan standartların ölçüleceği tüplere 190 µl, örneklerin ölçüleceği tüplere ise 199 µl konuldu.
- 4) İki standarttan da 10 µl alınarak, 190 µl 'lik karışım içeren tüplere eklendi.
- 5) İncelenecek örneklere ait izolatlardan da 1 µl alınarak, 199 µl'lik karışım içeren tüplere eklendi.
- 6) Elde edilen karışımlar kısa süre vortekslenerek, 5 dakika oda ısısında bekletildi.
- 7) Öncelikli olarak standartların Qubit™ fluorometer cihazında DNA konsantrasyonları belirlenerek aletin kalibrasyonu sağlandı.
- 8) Kalibre edilen Qubit™ fluorometer cihazında sırasıyla örnekler ölçülerek miktarları not edildi.

3.4.3. PCR Aşaması

D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441, D1S1677 miniSTR lokuslarının PCR'ı Coble M.D. ve ark.'nın 2005'te yayınladıkları çalışma temel alınarak yapıldı.

3.4.3.1. Primerlerin Sulandırılması

Firmadan liyofilize halde alınan PCR primerleri (Tablo 7), ultra saf su ile sulandırılarak primer konsantrasyonları 100 µM olacak şekilde ana stoklar hazırlandı. Elde edilen stok çözeltiler -20°C de muhafaza edildi.

Tablo 7. PCR' da kullanılan floresan işaretli primer baz dizileri

Lokusun Adı	Primer Dizini (5' - 3')
D1S1677	İleri [TET] -TTCTGTTGGTATAGAGCAGTGTTT Geri *GTGACAGGAAGGACGGAATG
D2S441	İleri [HEX] -CTGTGGCTCATCTATGAAAACCTT Geri *GAAGTGGCTGTGGTGTATGAT
D4S2364	İleri [FAM] -CTAGGAGATCATGTGGGTATGATT Geri *GCAGTGAATAAATGAACGAATGGA
D10S1248	İleri [FAM] -TTAATGAATTGAACAAATGAGTGAG Geri *GCAACTCTGGTTGTATTGTCTTCAT
D14S1434	İleri [HEX] -TGTAATAACTCTACGACTGTCTGTCTG Geri *GAATAGGAGGTGGATGGATGG
D22S1045	İleri [TET] -ATTTTCCCCGATGATAGTAGTCT Geri *GC GAATGTATGATTGGCAATATTTT

3.4.3.2. Primer Konsantrasyonları

Çalışılan 6 yeni miniSTR lokusunun primer konsantrasyonlarını ayarlamak için, genotipini bildiğimiz pozitif kontrol DNA örnekleri (9947A - K562) kullanıldı (Hill C.R. ve ark. 2006 - A). Hangi primer konsantrasyonunda en iyi pik boyutunu elde edeceğimizi belirlemek için PCR denemeleri bu DNA'larla yapıldı. İlk olarak lokuslar tek tek çalışılarak konsantrasyonlar denendi. Daha sonra lokuslar multipleks çalışılarak çeşitli konsantrasyon denemeleri yapıldı. Sonuçta en iyi pik elde ettiğimiz primer konsantrasyonları Tablo 8'de belirtildiği gibidir.

Tablo 8. NC01 ve NC02'nin primer konsantrasyonları

Grup	Lokusun adı	Coble M.D. ve ark. 'nın önerdiği primer Konsantrasyonu	Bu Tez Çalışmasında Kullanılan Primer Konsantrasyonu
NC01	D10S1248	1,3µM	1,6µM
	D14S1434	1,3µM	1,8µM
	D22S1045	0,8µM	1,5µM
NC02	D1S1677	1,3µM	1,5 µM
	D2S441	0,7µM	1,7 µM
	D4S2364	1,1µM	1,3 µM

D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441, D1S1677 miniSTR lokuslarının PCR'ları 3'lü multipleks oluşturarak çalışıldı.

1. Multipleks: **NC01**: (D10S1248, D14S1434, D22S1045),
2. Multipleks: **NC02**: (D4S2364, D2S441, D1S1677) (Coble M.D. ve ark. 2005).

3.4.3.3. Primer Karışımının Hazırlanması

Konsantrasyonları belirlenen miniSTR lokus primerleri kendi multipleks grubu içinde eşit hacimlerde karıştırıldı.

NC01 Primer karışımı; Eşit hacimde:

D10S1248(1,6µM), D14S1434(1,8µM) ve D22S1045(1,5µM) primerlerinin karıştırılmasıyla oluşturuldu.

NC02 Primer karışımı; Eşit hacimde:

D4S2364(1,3µM), D2S441(1,7µM) ve D1S1677(1,5µM) primerlerinin karıştırılmasıyla oluşturuldu.

PCR karışımı her bir örnek için toplam 25 µL olacak şekilde hazırlandı.

TopTaq™ Master Mix Kit kullanılarak bir reaksiyon için oluşturulan PCR karışımı:

- 12,5 µL TopTaq™ Master Mix Kit - QIAGEN®
- 5 µL Primer Mix ileri
- 5 µL Primer Mix geri
- 0,5 µL dH₂O
- 2 µL (1 ng/ µL) DNA izolatu

Toplam hacim = 25 µL

3.4.3.4. PCR Programı

PCR GeneAmp® 9700 (Applied Biosystems) ısı döngü cihazında yapıldı.

95 °C de 10 dakika

94 °C de 1 dakika
55 °C de 1 dakika
72 °C de 1 dakika

} 32 döngü

60 °C de 45 dakika

(Coble M.D. ve ark. 2005)

3.4.4. PCR Ürünlerinin ABI 310 Genetik Analizör Cihazında Analizi

3.4.4.1. Örnek Hazırlanması

ABI 310' da analiz edilecek her bir örnek için aşağıdaki gibi karışım hazırlandı:

4. 12,5 µL Hi-Di™ formamide (Applied Biosystems),
5. 0.5 µL GeneScan™ - 350 TAMRA™ Size Standard (Applied Biosystems)
6. 1 µL PCR ürünü

Analiz için hazırlanan karışım, 5 dakika 95 °C'de denatüre edildi, hemen ardından 3 dakika buzda bekletildi.

3.4.4.2. Örneklerin Elektrofrez

Yukarıda hazırlanan PCR ürün karışımı ABI PRISM® 310 cihazına yerleştirildi. Örnekler, 36 cm kapillerle, POP-4 polimeri kullanarak, enjeksiyon süresi 5 saniye, yürütme süresi 24 dakika olacak şekilde 60⁰C’de ve 15000 V’de DS-34 Matrix standartı ve GS POP-4 (1ml) - C Filtresi seçilerek yürütüldü.

3.4.4.3. Örneklerin Analizi

Elektroforez sonrasında elde edilen pikler GeneScan 3.7 programında analiz edildi. Örneklerin alel tiplerini belirlemek için, NIST – National Institute of Standard and Technology’de daha önceden alel tipleri belirlenmiş olan (Şekil 11) 9947A ve K562 pozitif kontrole ait DNA örnekleri kullanıldı. Bu DNA’ların alel tipleri bilindiğinden, elde edilen piklerin değerlendirilmesi bu örneklere göre yapıldı.

30 kişiye ait kan lekesi ve çeşitli yüzeylerde bekletilmiş kan lekelerinin analizinde; yine NIST’te Hill C.R. ve ark. tarafından yapılan çalışmadaki (Hill C.R. ve ark. 2006-A); 26 yeni miniSTR lokusunun her birine ait alel büyüklüğüne denk gelen alel tiplerini içeren tablo kullanılmıştır. Örneklerin analizi bu tabloya (Tablo 9) göre belirlenmiştir. Aynı zamanda elektroforezde her örnekle beraber pozitif kontrol (9947A-K562)’de yürütüldü, analiz sırasında hem örnek hem de pozitif kontrol karşılaştırılarak tiplendirme yapıldı. Bu şekilde tüm örneklerin 6 miniSTR lokusu tiplendirilmiş oldu.

Tablo 9. Lokusların büyüklük (size) ve alel aralığı

MİNİPLEX 2 NC02	Lokus Adı	Alel Büyüklük (Size) Aralığı	Alel Tip Aralığı
	D1S1677	77 _117	9_19
	D2S441	78 _110	9_17
	D4S2364	67 _83	7_11
MİNİPLEX 1 NC01	D10S1248	79 _123	8_19
	D14S1434	70 _102	9_17
	D22S1045	76 _109	8_19

(Hill C.R. 2006-A’ dan alınmıştır)

Lokus	Pozitif Kontrol DNA Örnekleri				SRM 239 1b Bileşenleri							
	9947A	9948	ABI 007	K562	Genomic 1	Genomic 2	Genomic 3	Genomic 4	Genomic 5	Genomic 6	Genomic 7	Genomic 8
D1GATA113	11,12	7,12	12,12	11,12	11,11	12,13	11,11	13,13	11,12	11,12	10,12	10,12
D1S1627	13,14	11,13	11,14	10,14	10,14	13,14	13,14	11,12	14,15	11,13	11,14	13,14
D1S1677 (NC02)	13,14	13,14	13,13	13,14	12,13	14,16	14,17	14,15	13,14	13,14	12,13	14,16
D2S441 (NC02)	10,14	11,12	14,15	10,14	11,14	11,14	10,14	12,14	11,14	10,11	11,14	11,11,3
D2S1776	10,10	10,12	8,10	11,11	11,12	11,11	8,10	11,12	12,13	11,12	11,12	11,12
D3S3053	9,11	9,12	9,9	12,12	9,12	10,11	9,11	11,11	11,11	9,9	11,11	9,9
D3S4529	13,13	12,12	13,13	14,14	14,15	13,16	14,16	15,16	13,15	15,17	14,16	14,14
D4S2364 (NC02)	9,10	9,10	9,10	9,9	9,9	9,10	9,10	9,9	9,10	8,9	9,9	9,9
D4S2408	9,10	10,10	10,11	10,11	10,10	9,9	8,9	9,10	10,11	9,9	8,11	11,11
D5S2500	14,23	14,17	17,18	14,14	17,18	17,24	17,18	17,18	14,15	14,18	14,20	14,18
D6S474	14,18	17,17	14,14	15,18	15,17	14,17	14,15	14,16	15,18	14,17	15,17	17,17
D6S1017	9,10	8,8	10,10	8,11	10,10	10,12	10,12	7,10	8,9	10,10	7,12	10,12
D8S1115	9,18	15,17	15,17	16,16	16,16	16,16	16,17	9,17	9,15	9,16	9,18	15,16
D9S1122	12,13	12,15	12,12	10,14,15	11,12	12,13	12,12	12,12	11,13	11,12	11,12	13,13
D9S2157	7,13	7,11	13,13	13,13	8,13	9,11	11,13	11,11	7,14	11,13	12,15	11,11
D10S1248 (NC01)	13,15	12,15	12,15	12,12	14,16	13,15	13,16	12,12	14,15	14,15	13,14	11,15
D10S1435	10,11	12,13	11,13	10,12	13,13	11,14	13,14	12,12	11,12	12,12	12,12	11,13
D11S4463	12,13	12,14	14,14	13,14	14,14	13,14	14,15	11,12	13,15	15,16	13,14	13,16
D12ATA63	13,13	13,18	13,17	17,17	14,17	13,17	12,15	16,18	13,15	14,18	16,17	14,15
D14S1434 (NC01)	11,13	13,14	11,14	10,10	13,14	11,13	14,15	10,11	13,14	13,14	10,14	13,13
D17S974	7,10	10,11	9,10	8,8	9,11	9,10	9,9	7,9	11,12	9,9	11,11	8,9*
D17S1301	12,12	11,12	12,13	11,12	11,11	11,12	11,12	12,13	11,11	11,11	11,12	12,12
D18S853	11,14	11,11	11,11	12,15	11,14	11,11	11,11	11,13	10,15	11,14	14,14	12,13
D20S482	14,15	13,14	14,15	15,15	14,14	14,16	15,15	14,15	14,15	14,14	14,14	15,16
D20S1082	11,14	11,15	12,14	11,11	11,15	14,15	11,11	14,15	11,14	11,15	14,15	11,15
D22S1045 (NC01)	11,14	16,18	11,16	16,16	14,15	11,16	15,16	17,18	11,14	11,15	11,15	16,17

Şekil 11. Pozitif kontrol DNA genotipleri*

*(http://www.cstl.nist.gov/strbase/miniSTR/miniSTR_NC_loci_types.htm)

3.5. D1S1677, D2S441, D4S2364, D10S1248, D14S1434, D22S1045 Yeni miniSTR Lokuslarının Optimizasyonu

- İlk olarak Coble M.D. ve ark.'nın kullandığı floresan boyalar üzerinde modifikasyon yapıldı. Primerler VIC yerine HEX, NED yerine TET ile işaretlendi (Tablo 7).
- Coble M.D. ve ark. 'nın önerdiği konsantrasyonlar üzerinde modifikasyonlar yapıldı. Her lokusun ana stok primer çözeltisinden çeşitli konsantrasyonlar hazırlandı (0.7, 1, 1.2, 1.3 - 2 µM). En iyi pik boyunu elde etmek için hazırlanan çeşitli konsantrasyonlardaki primerler, alel tipleri önceden belirlenmiş (NIST – National Institute of Standard and Tecnology) kontrol DNA'lar (9947A,K562) kullanılarak PCR ve elektroforez aşamalarından sonra değerlendirmeler sonucu son konsantrasyonlarına karar verildi (Tablo 8).
- PCR karışımında kullanılan malzemelerde de modifikasyonlar yapıldı. Coble ve ark.'nın tek tek kullandığı PCR bileşenleri (MgCl₂ (25mM), 10X PCR tamponu, 10 mM dNTP, BSA (3,2 mg/mL), TaqGold DNA Polymerase (5 U/µL), dH₂O)

yerine hepsini tek karışımında içeren TopTaq™ Master Mix Kit - QIAGEN® kullanıldı.

- Applied Biosystems'in yayınladığı standart boya setleri arasından seçilen 6-FAM (Mavi), TET (yeşil) ve HEX (Sarı) boylarına uygun matriks standart olan DS-34 Matrix standart (Flourescent Amidite Matrix Standart Kit for 310 system) oluşturuldu. Bu matriks standarta uygun size standart olan GeneScan™ - 350 TAMRA™ Size Standard (Applied Biosystems) kullanıldı. DS-34 Matrix standarta uyumlu C filtresi seçildi (Şekil 12).

Applied Biosystems Standard Dye Sets for Genotyping Applications								
Dye Set	DS-02	DS-20'	DS-30	DS-31	DS-32	DS-33	DS-34	DS-40
Filter Set	E5	A	D	D	F	G5	C	S
Blue Dyes	dR110	5-FAM™	6-FAM™	6-FAM	5-FAM	6-FAM	6-FAM	6-FAM
Green Dyes	dR6G	JOE™	HEX™	VIC®	JOE	VIC	TET™	dR6G
Yellow Dyes	dTAMRA™	TAMRA™	NED™	NED	NED	NED	HEX	
Red Dyes	dROX™	ROX™	ROX	ROX	ROX	PET®	TAMRA	
Orange Dyes	LIZ®					LIZ		LIZ

Şekil 12. Applied Biosystems'in ABI PRISM® 310 için standart boya setleri*

*Şekil www.appliedbiosystems.com'dan alınmıştır.

3.6. Optimizasyona Ek Yapılan alışmalar

3.6.1. Duyarlılık alışması

Duyarlılık çalışmasında, kontrol DNA (9947A) rneği çeşitli oranlarda sulandırarak (0,005 - 0,025 - 0,05 - 0,1 - 0,5 ng/μL) PCR'da kullanıldı. Elektroforez sonrası analiz edilerek kullanılabilir en az miktarda DNA belirlendi.

3.6.2. Karışım alışması

Karışım çalışmasında; iki kişiye ait kan örnekleri belli oranlarda (1/10, 1/100, 1/1000) karıştırıldı. Bu karışımın DNA izolasyonları ve DNA miktar tayinleri yapıldı. Daha sonra bu izolatlar kullanılarak yukarıda belirtilen PCR ve elektroforez aşamaları uygulandı.

3.6.3. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik aşamasında, aynı örnek her biri birer hafta arayla olmak üzere 4 defa tekrarlanarak çalışıldı.

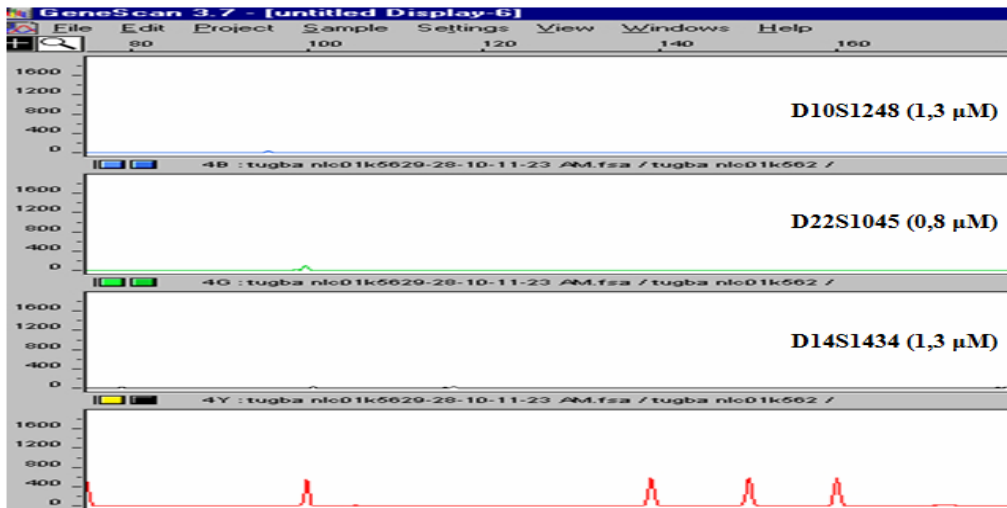
4. BULGULAR

Bu çalışmada, rızaları alınmış olan İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü yüksek lisans öğrencilerinden oluşan 30 kişiden alınan kan örneklerinde 6 yeni miniSTR lokusu (D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441, D1S1677) tiplendirildi. Ayrıca bekletilmiş kan örneklerinde de söz konusu STR lokuslarının tipleme gücünü ölçmek için; çeşitli yüzeylere (kot, penye, döşeme, havlu, laminant parke, kalebodur arası dolgu malzemesi, bıçak kabzası, kapı kilit demiri) damlatılmış ve değişik sürelerde (1 hafta, 1 ay, 3 ay ve 6 ay) bekletilmiş kan örnekleri de çalışıldı.

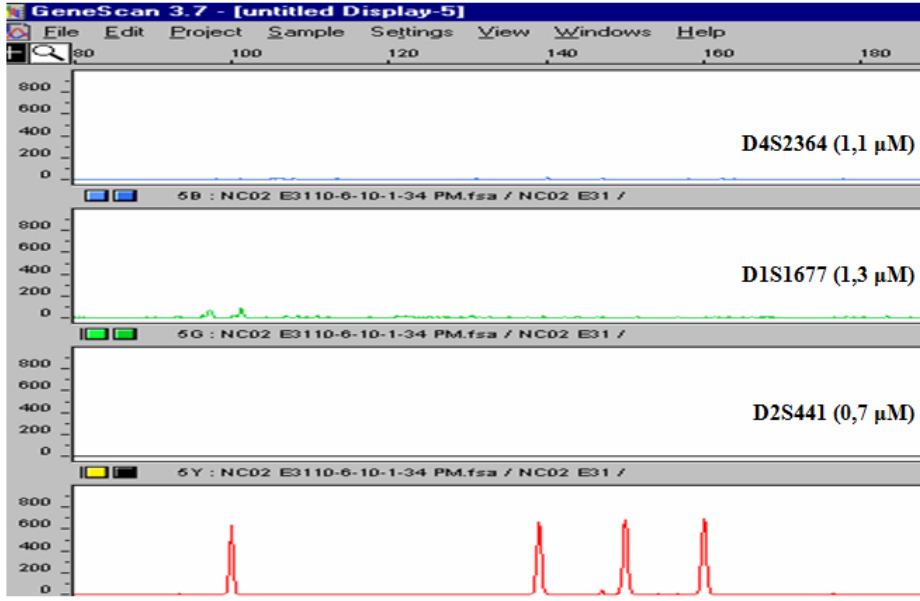
Örnekleri çalışmaya başlamadan önce 9947A ve K562 kontrol DNA ile 6 miniSTR lokusunun optimizasyonu yapıldı. Bunun için Coble M.D. ve ark. (2005)'nin geliştirmiş olduğu yöntemde çeşitli modifikasyonlar yapılarak tez çalışması gerçekleştirildi.

4.1. Primer Konsantrasyonları Üzerinde Yapılan Modifikasyonlar

Coble M. D. ve ark.'nın çalışmasına göre primer konsantrasyonları aynı kalmak koşuluyla TopTaq™ Master Mix Kit ve 6-FAM, TET, HEX floresan boylarıyla işaretli primerler kullanılarak yapılan çalışmada sonuç (pik) elde edilemedi (Şekil 13 ve 14).

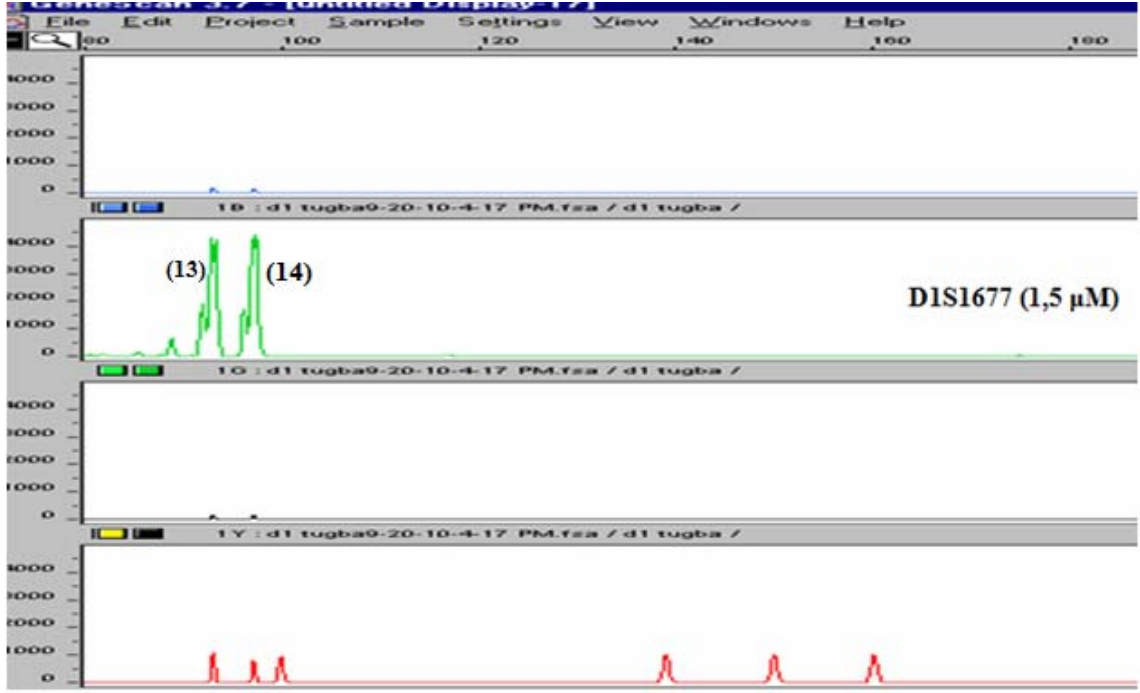


Şekil 13. NC01 multipleksinin D10S1248 1,3 µm, D14S1434 1,3 µm ve D22S1045 0,8 µm konsantrasyonları kullanılarak yapılan çalışma

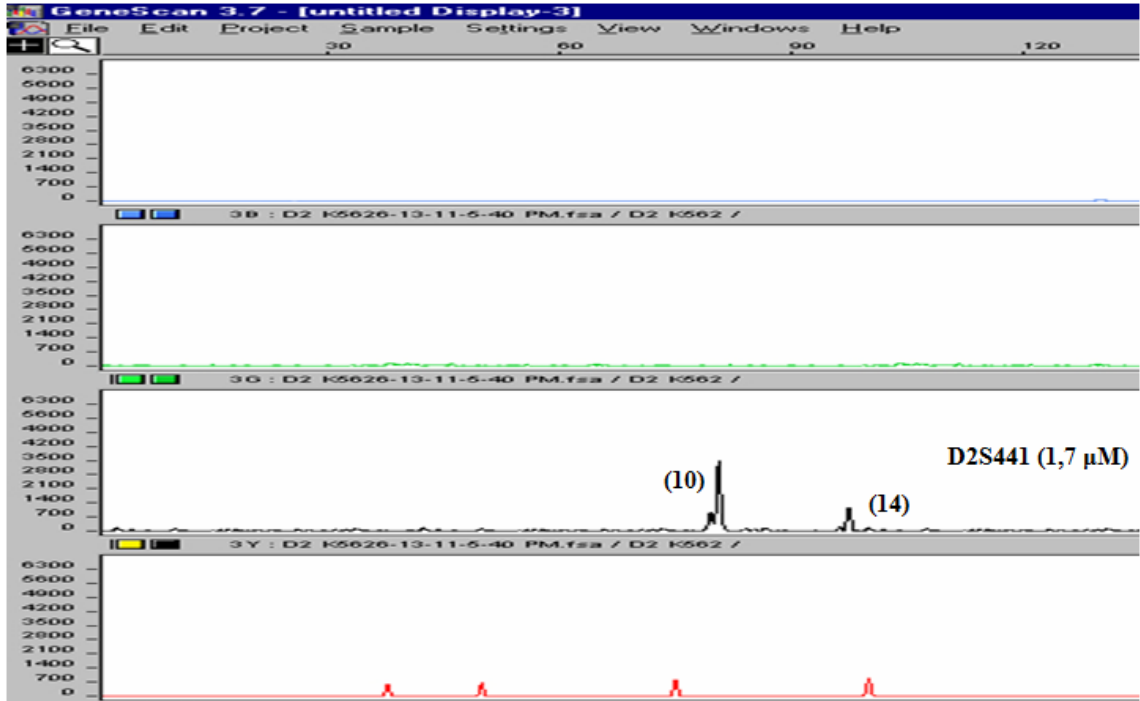


Şekil 14. NCO2 multipleksinin D1S1677 1,3 µM, D2S441 0,7 µM, D4S2364 1,1 µM konsantrasyonları kullanılarak yapılan çalışma

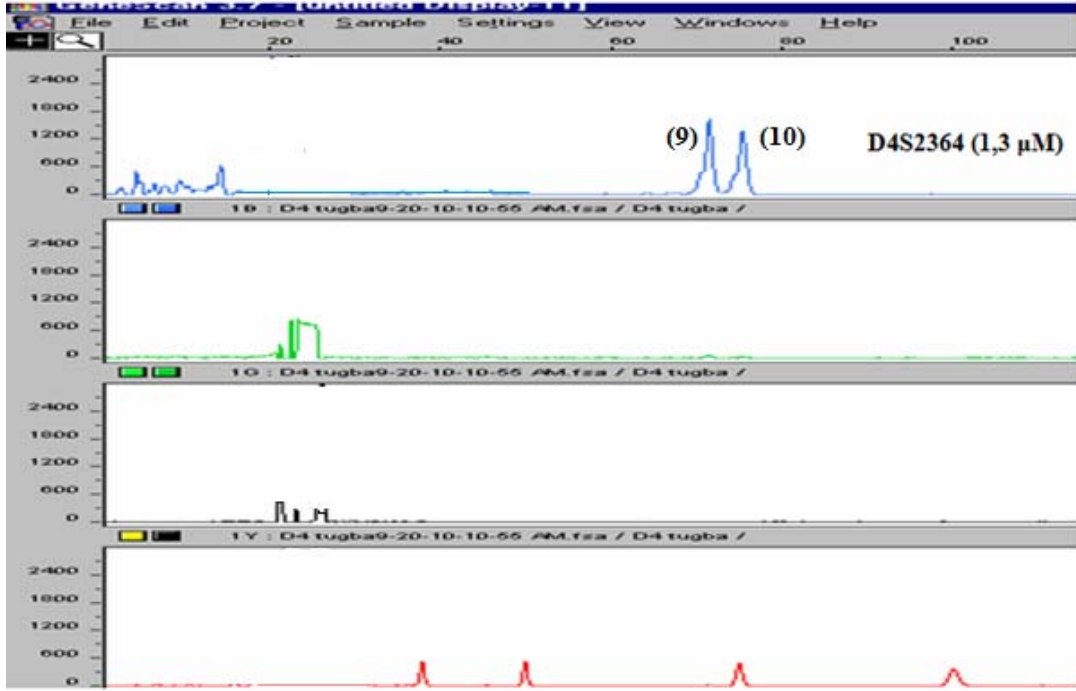
İstenilen sonuç elde edilemediği için primer konsantrasyonları üzerinde modifikasyonlar yapıldı. En iyi pik sonuçlarını elde etmek için sırasıyla çeşitli konsantrasyonlar denendi. Bu denemelerde, önce pozitif kontrol DNA (9947A ve K562) örnekleri kullanılarak her lokus tek tek çalışıldı ve en uygun primer konsantrasyonları belirlendi: D1S1677 1,3 µM'dan 1,5'e, D2S441 0,7 µM'dan 1,7'ye, D4S2364 1,1 µM'dan 1,3'e D10S1248 1,3µM'dan 1,6'ya, D14S1434 1,3 µM'dan 1,8'e, D22S1045 0,8 µM'dan 1,5'e yükseltildi. Daha sonra bu konsantrasyonlara göre lokuslar multipleks çalışılarak yeni konsantrasyonların multipleks çalışmaya uygun olduğu saptandı. Lokusların yeni primer konsantrasyonlarıyla elde edilen elektroforegramlar Şekil 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ve 22'de verilmektedir.



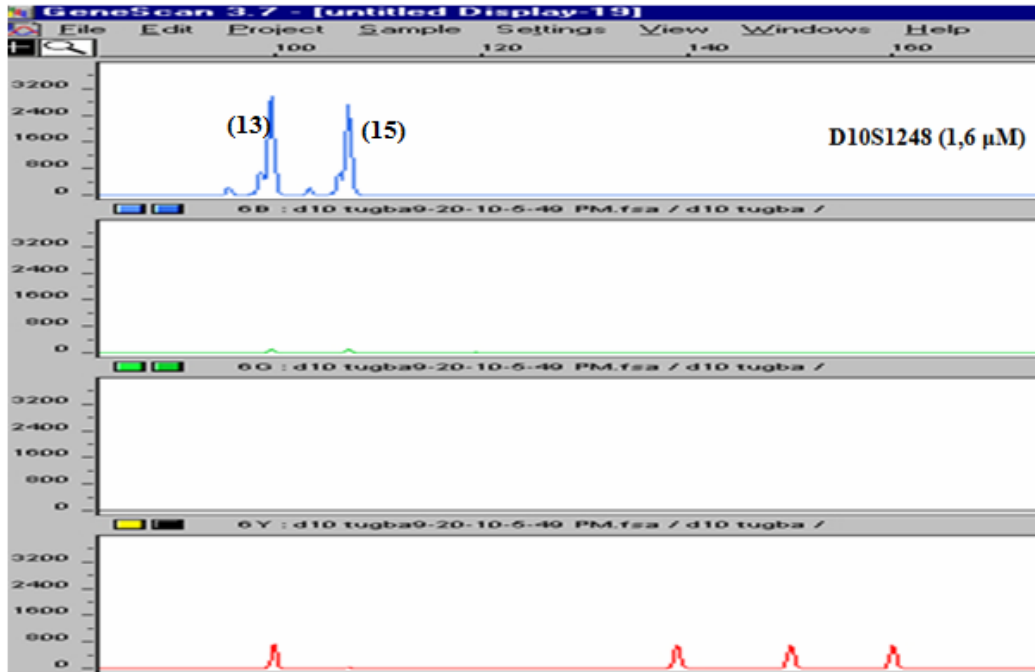
Şekil 15. D1S1677 lokusunun 1,5 µM primer konsantrasyonunda yapılan çalışma sonucuna ait elektroforegramı



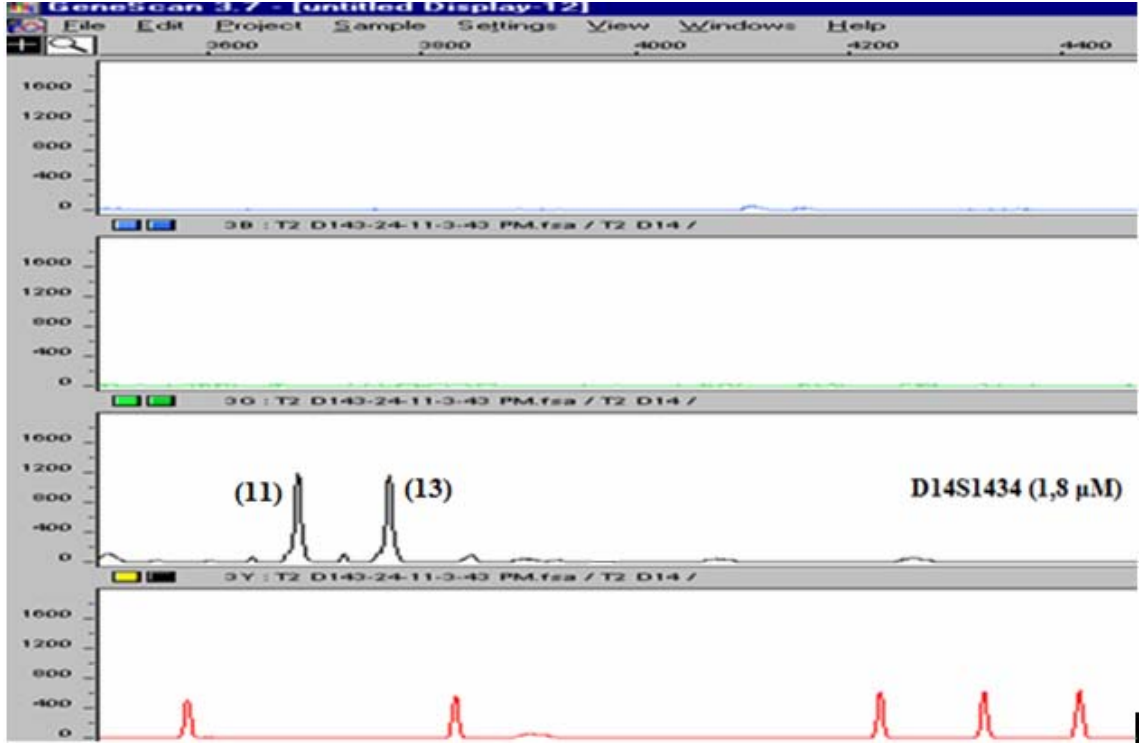
Şekil 16. D2S441 lokusunun 1,7 µM primer konsantrasyonunda yapılan çalışma sonucuna ait elektroforegramı



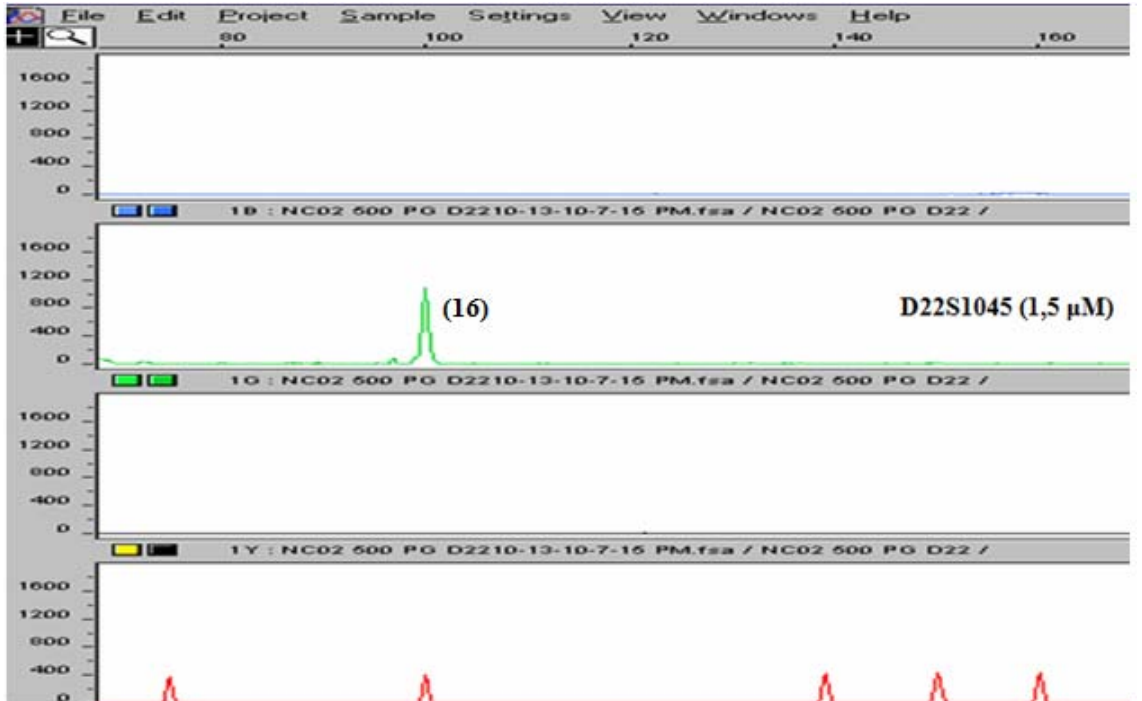
Şekil 17. D4S2364 lokusunun 1,3 µM primer konsantrasyonunda yapılan çalışma sonucuna ait elektroforegramı



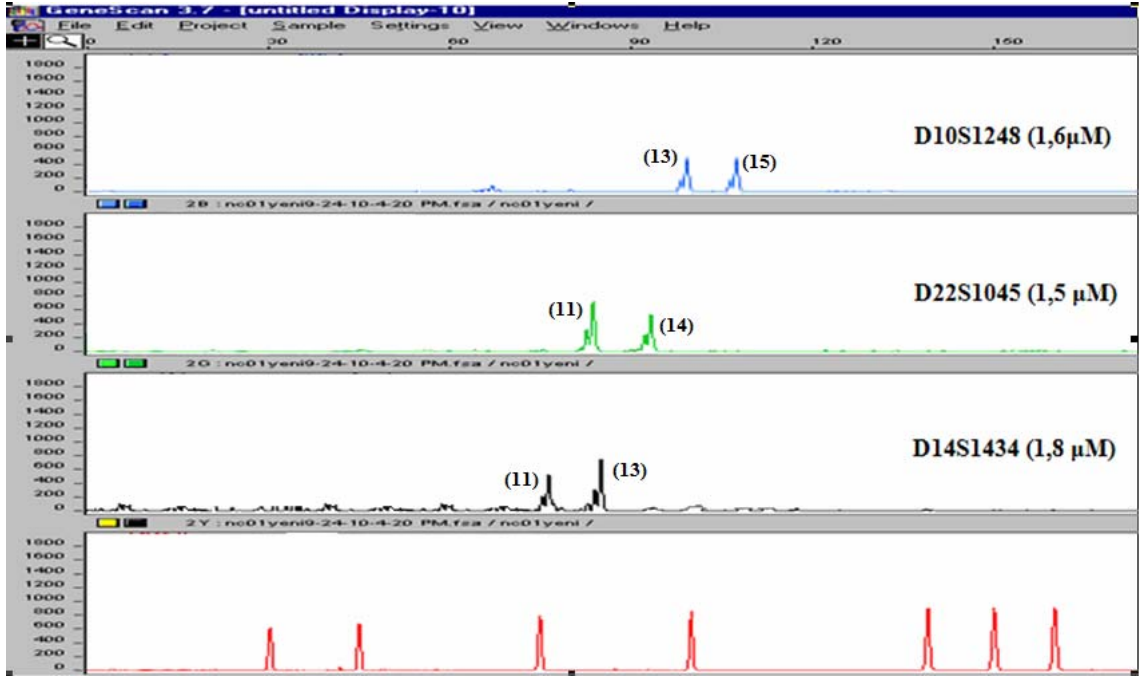
Şekil 18. D10S1248 lokusunun 1,6 µM primer konsantrasyonunda yapılan çalışma sonucuna ait elektroforegramı



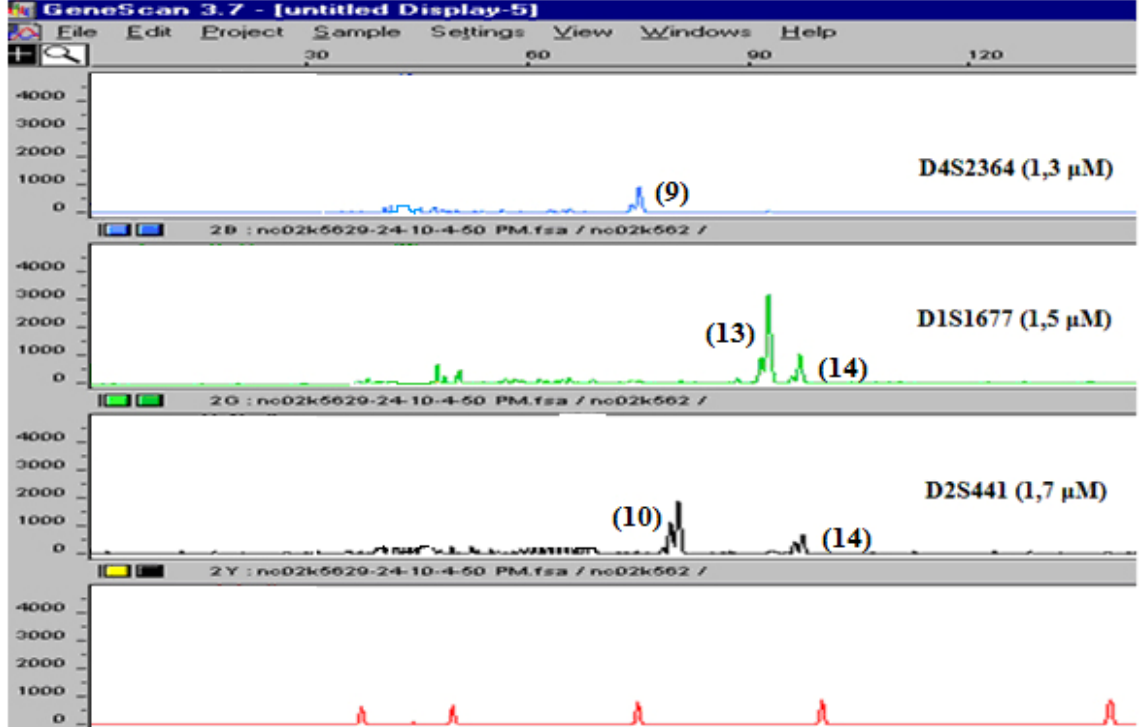
Şekil 19. D14S1434 lokusunun 1,8 µM primer konsantrasyonunda yapılan çalışma sonucuna ait elektroforegramı



Şekil 20. D22S1045 lokusunun 1,5 µM primer konsantrasyonunda yapılan çalışma sonucuna ait elektroforegramı



Şekil 21. NC01 multipleksinin D10S1248 1,6 μM , D14S1434 1,8 μM , D22S1045 1,5 μM konsantrasyonlarında yapılan çalışma sonucuna ait elektroforegramı



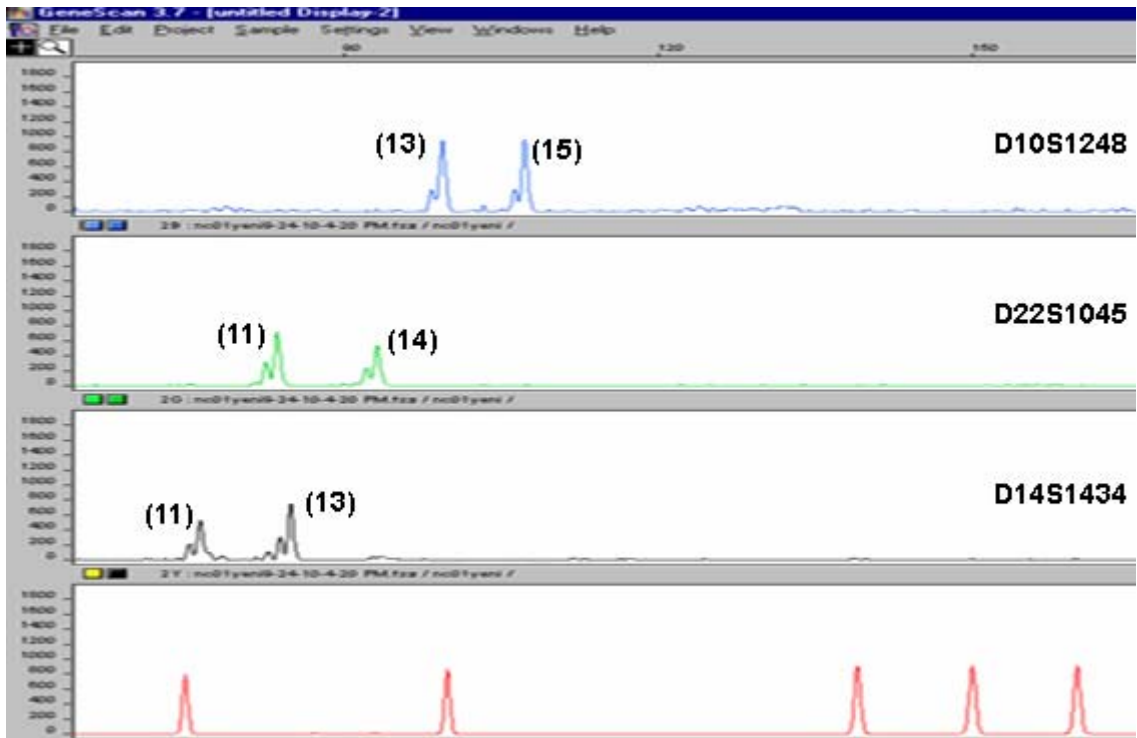
Şekil 22. NC02 multipleksinin D1S1677 1,5 μM , D2S441 1,7 μM , D4S2364 1,3 μM konsantrasyonlarında yapılan çalışma sonucuna ait elektroforegramı

4.2. 30 Kişiyeye Ait Kan Örneklerinde 6 Yeni Mini STR (D1S1677, D2S441, D4S2364, D10S1248, D14S1434, D22S1045) Lokusuna Ait DNA Profili

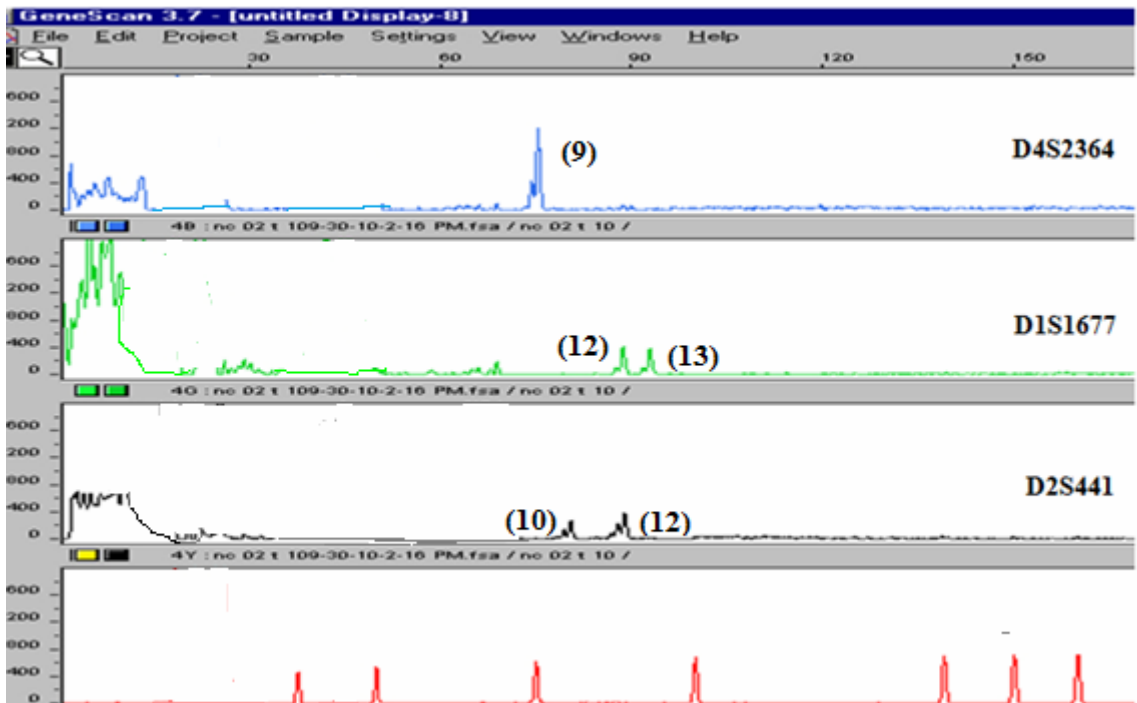
30 kişiyeye ait kan örneklerinde (taze kan lekesi) D1S1677, D2S441, D4S2364, D10S1248, D14S1434, D22S1045 miniSTR lokusları çalışıldı. Bu kişilerin alel tipleri Tablo 10’da verilmiştir. Bu kan örneklerinin NC01 ve NC02 multipleksine ait elektroforegramları Şekil 23 ve 24’de gösterilmiştir.

Tablo 10: 30 kişiyeye ait kan örneklerinde 6 miniSTR lokusuna ait DNA profili

Lokus Örnek	D1S1677	D2S441	D4S2364	D10S1248	D14S1434	D22S1045
1.	14_14	11,3_13,3	9_9	14_15	12,3_12,3	15_15
2.	13_13	11_14	9_10	9_19	13_15	18_19
3.	15_16	11_14	9_10	15_19	12_15	15_15
4.	14_15	11_14	8_8	15_17	9,3_14	14_15
5.	14_15	12_14	9_9	15_15	13_13	11_15
6.	13_15	10_11	9_10	15_15	13_13	11_13
7.	14_14	11_11	10_10	16_17	13_13	14_14
8.	14_14	10_14	8_10	16_16	13_14	14_14
9.	14_14	11_11	9_9	10_15	13_14	13_14
10.	12_13	10_12	9_9	15_15	10,3_13	13_14
11.	15_16	11_12	8_8	15_18	14_14	14_15
12.	14_15	14_14	10_10	17_19	13_14	14_15
13.	14_14	9_9	9_10	16_16	13_14	12_16
14.	14_14	10_14	8_9	15_16	9,3_14	14_15
15.	14_14	10_11	7_10	15_17	13_13	14_15
16.	14_15	10_14	9_10	15_16	13_16	14_15
17.	12_14	10_14	8_9	15_16	13_14	14_15
18.	12_14	11_11	9_9	16_16	10,3_13	11_15
19.	13_14	14_14	9_9	15_15	13_14	11_11
20.	13_15	11_14	9_10	15_18	9,3_14	11_14
21.	15_16	10_14	9_10	11_17	14_14	11_14
22.	13_14	10_12	9_10	16_17	14_15	14_15
23.	14_15	11_11	9_9	15_17	13_14	14_15
24.	14_15	14_14	9_9	17_18	10_12,3	15_16
25.	12_13	14_14	7_7	14_16	10,3_13,3	14_14
26.	14_15	11_13	9_10	15_16	12,3_12,3	14_16
27.	13_15	10_11	9_9	15_17	10,3_13	14_15
28.	14_15	10_12	8_10	16_18	13_14	14_14
29.	13_13	11_14	8_9	15_15	11,3_13,3	14_15
30.	14_14	11_14	9_10	16_17	12,3_13,3	11_15



Şekil 23. Taze kan lekelerinin NC01 multipleksine ait elektroforegramı



Şekil 24. Taze kan lekelerinin NC02 multipleksine ait elektroforegramı

4.3. Çeşitli Yüzeyler Üzerinde Bekletilmiş Kan Lekelerinin 6 miniSTR Lokusuna Ait DNA Tiplemesi

Bir kişiden alınan kan örneği çeşitli yüzeylere (Kot, penye, havlu, döşeme, bıçak kabzası, kapı kilit demiri, kalebodur arası dolgu-derz ve laminant parke) damlatıldı. 1 hafta, 1 ay, 3 ay ve 6 ay bekletilerek 6 miniSTR lokusu tiplendirildi. Bu örneklere ait alel tipleri sırasıyla Tablo 11, Tablo 12, Tablo 13 ve Tablo 14'te verilmiştir. Bekletilmiş örneklerin hepsinde tüm lokuslar başarıyla tiplendirildi. 1 hafta, 1 ay, 3 ay ve 6 ay bekletilmiş örneklere ait elektroforegram Şekil 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 ve 32'de verilmiştir.

Tablo 11: 1 hafta bekletilmiş örneklerde 6 miniSTR lokusna ait alel profili

Örnek	Kot 1hafta	Penye 1hafta	Havlu 1hafta	Döşeme 1hafta	Bıçak 1hafta	Demir 1hafta	Kalebodur arası dolgu 1hafta	Laminant 1hafta
LOKUS	Alel Tipleri							
D1S1677	15_15	15_15	15_15	15_15	15_15	15_15	15_15	15_15
D2S441	10_14	10_14	10_14	10_14	10_14	10_14	10_14	10_14
D4S2364	9_9	9_9	9_9	9_9	9_9	9_9	9_9	9_9
D10S1248	13_16	13_16	13_16	13_16	13_16	13_16	13_16	13_16
D14S1434	9_13,3	9_13,3	9_13,3	9_13,3	9_13,3	9_13,3	9_13,3	9_13,3
D22S1045	13_14	13_14	13_14	13_14	13_14	13_14	13_14	13_14

Tablo 12: 1 ay bekletilmiş örneklerde 6 miniSTR lokusna ait alel profili

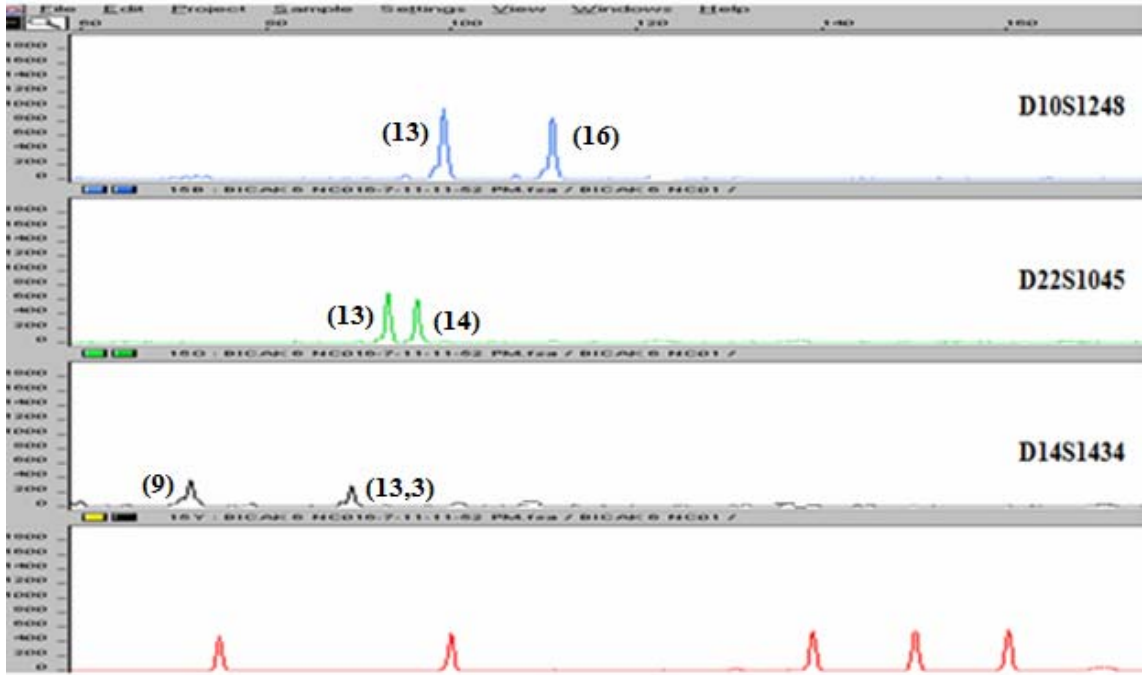
Örnek	Kot 1 ay	Penye 1 ay	Havlu 1 ay	Döşeme 1 ay	Bıçak 1 ay	Demir 1 ay	Kalebodur arası dolgu 1 ay	Laminant 1 ay
LOKUS	Alel Tipleri							
D1S1677	15_15	15_15	15_15	15_15	15_15	15_15	15_15	15_15
D2S441	10_14	10_14	10_14	10_14	10_14	10_14	10_14	10_14
D4S2364	9_9	9_9	9_9	9_9	9_9	9_9	9_9	9_9
D10S1248	13_16	13_16	13_16	13_16	13_16	13_16	13_16	13_16
D14S1434	9_13,3	9_13,3	9_13,3	9_13,3	9_13,3	9_13,3	9_13,3	9_13,3
D22S1045	13_14	13_14	13_14	13_14	13_14	13_14	13_14	13_14

Tablo 13: 3 ay bekletilmiş örneklerde 6 miniSTR lokusna ait alel profili

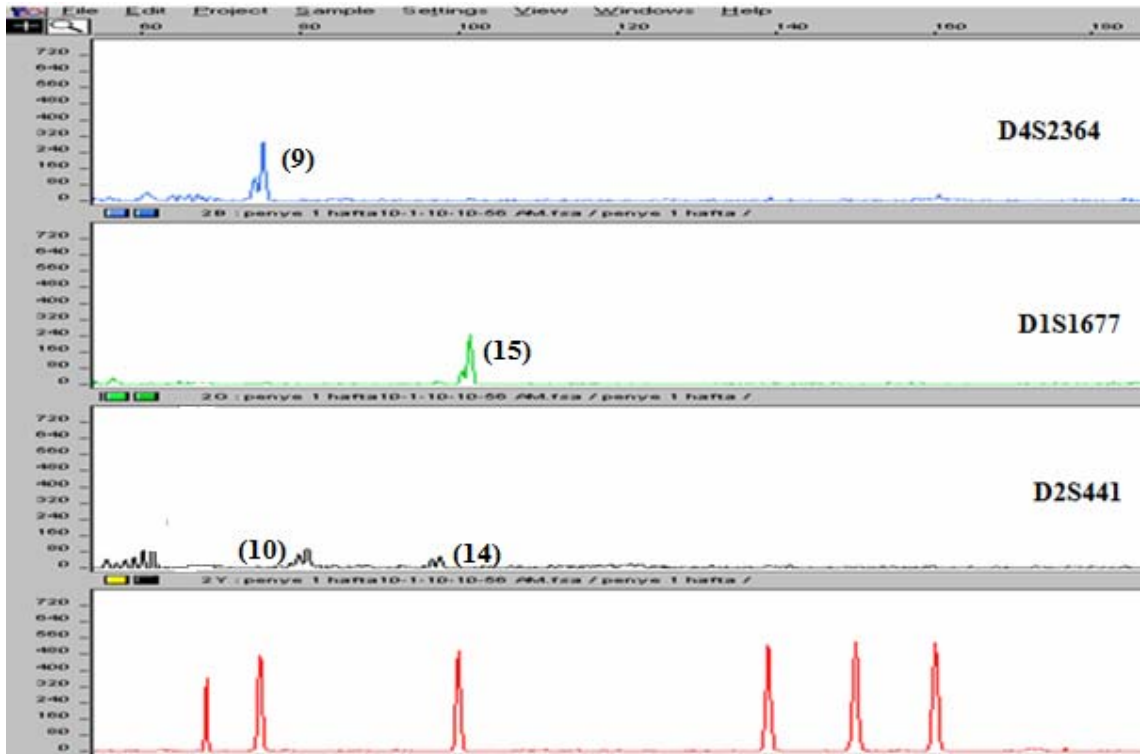
Örnek	Kot 3 ay	Penye 3 ay	Havlu 3 ay	Döşeme 3 ay	Bıçak 3 ay	Demir 3 ay	Kalebodur arası dolgu 3 ay	Laminant 3 ay
LOKUS	Alel Tipleri							
D1S1677	15_15	15_15	15_15	15_15	15_15	15_15	15_15	15_15
D2S441	10_14	10_14	10_14	10_14	10_14	10_14	10_14	10_14
D4S2364	9_9	9_9	9_9	9_9	9_9	9_9	9_9	9_9
D10S1248	13_16	13_16	13_16	13_16	13_16	13_16	13_16	13_16
D14S1434	9_13,3	9_13,3	9_13,3	9_13,3	9_13,3	9_13,3	9_13,3	9_13,3
D22S1045	13_14	13_14	13_14	13_14	13_14	13_14	13_14	13_14

Tablo 14: 6 ay bekletilmiş örneklerde 6 miniSTR lokusna ait alel profili

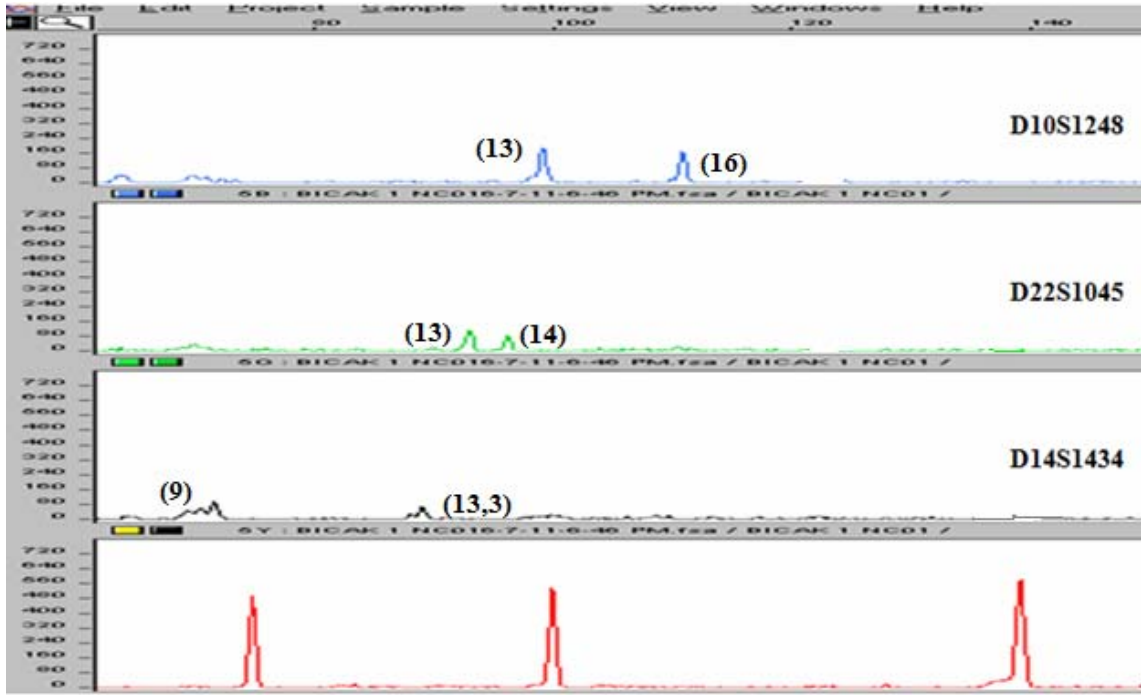
Örnek	Kot 6 ay	Penye 6 ay	Havlu 6 ay	Döşeme 6 ay	Bıçak 6 ay	Demir 6 ay	Kalebodur arası dolgu 6 ay	Laminant 6 ay
LOKUS	Alel Tipleri							
D1S1677	15_15	15_15	15_15	15_15	15_15	15_15	15_15	15_15
D2S441	10_14	10_14	10_14	10_14	10_14	10_14	10_14	10_14
D4S2364	9_9	9_9-	9_9	9_9	9_9	9_9	9_9	9_9
D10S1248	13_16	13_16	13_16	13_16	13_16	13_16	13_16	13_16
D14S1434	9_13,3	9_13,3	9_13,3	9_13,3	9_13,3	9_13,3	9_13,3	9_13,3
D22S1045	13_14	13_14	13_14	13_14	13_14	13_14	13_14	13_14



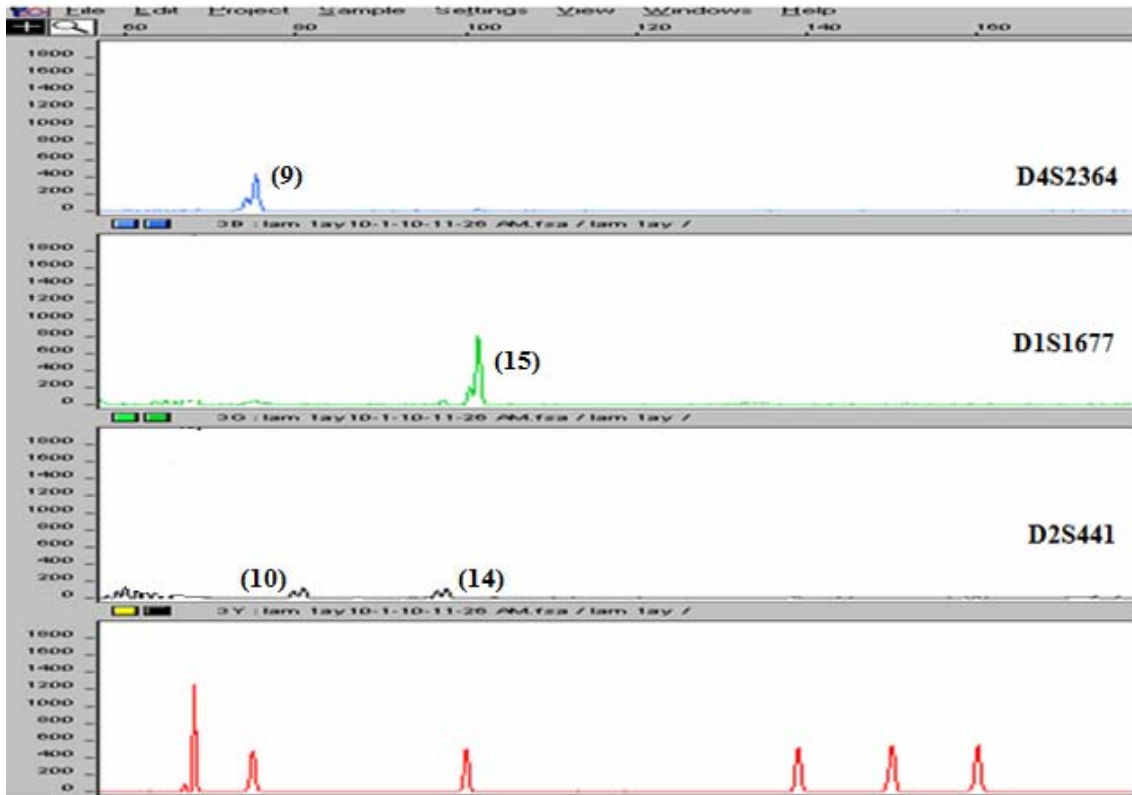
Şekil 25. 1 hafta bekletilmiş kan lekesinin NC01 multipleksine ait elektroforegramı



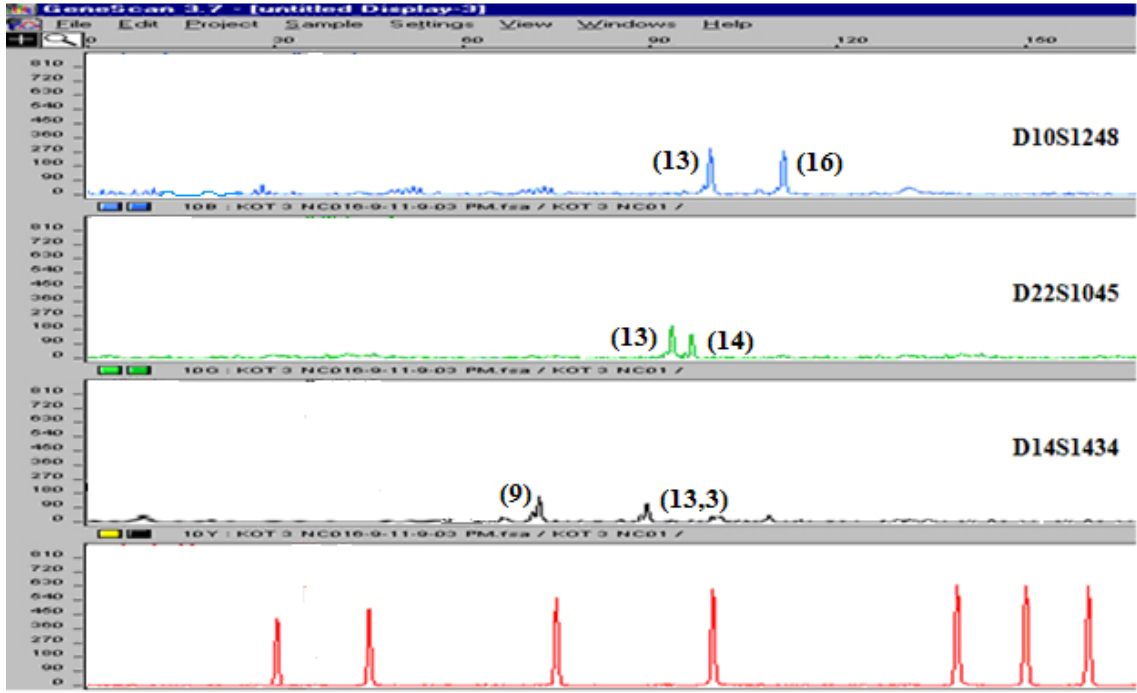
Şekil 26. 1 hafta bekletilmiş kan lekesinin NC02 multipleksine ait elektroforegramı



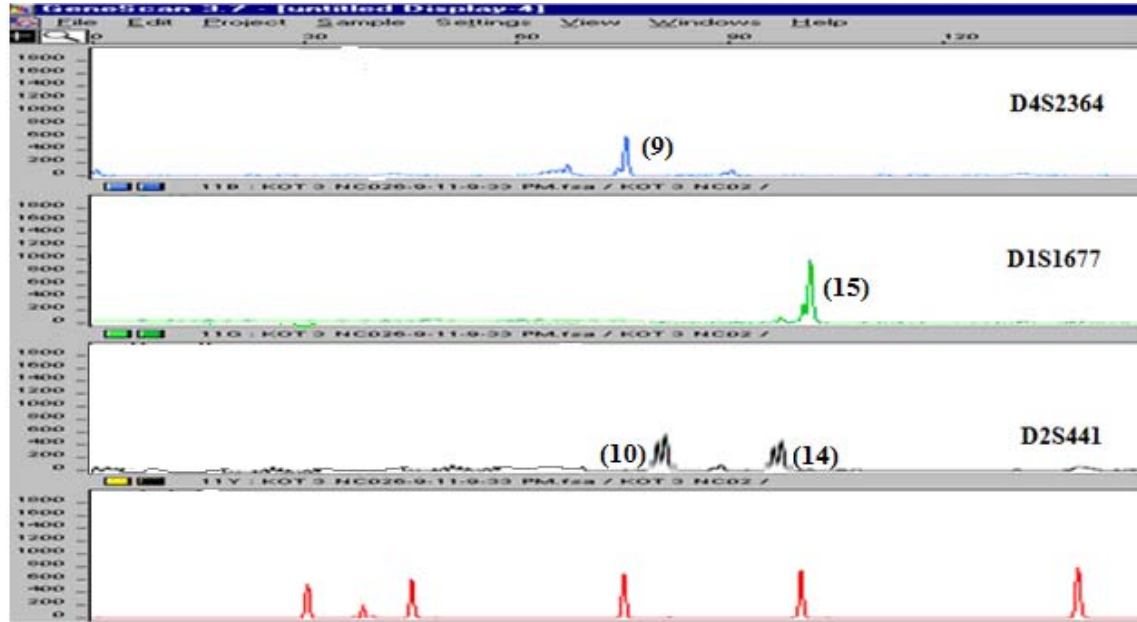
Şekil 27. 1 ay bekletilmiş kan lekesinin NC01 multipleksine ait elektroforegramı



Şekil 28. 1 ay bekletilmiş kan lekesinin NC02 multipleksine ait elektroforegramı



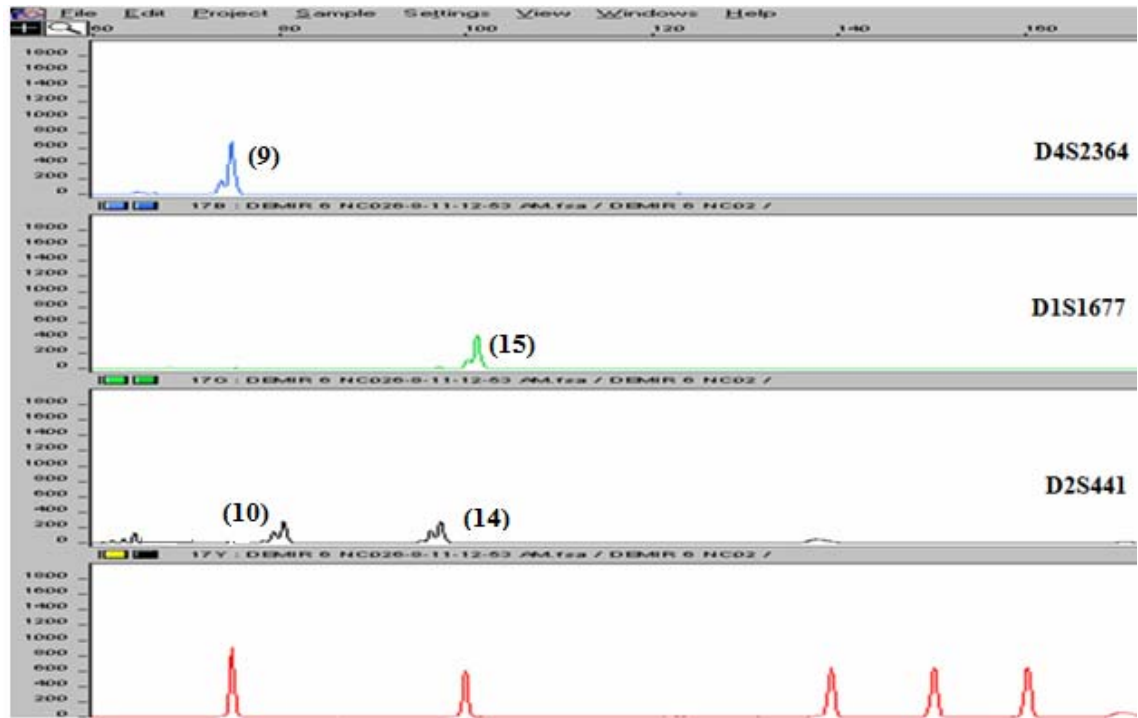
Şekil 29. 3 ay bekletilmiş kan lekesinin NC01 multipleksine ait elektroforegramı



Şekil 30. 3 ay bekletilmiş kan lekesinin NC02 multipleksine ait elektroforegramı



Şekil 31. 6 ay bekletilmiş kan lekesinin NC01 multipleksine ait elektroforegramı



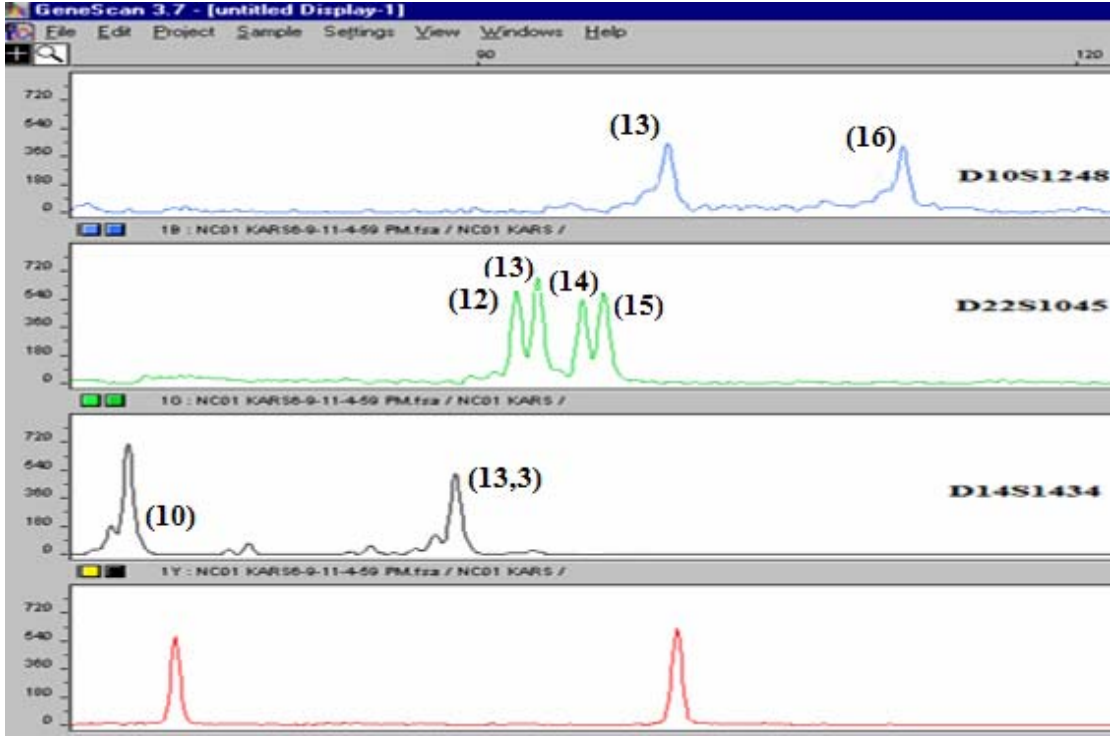
Şekil 32. 6 ay bekletilmiş kan lekesinin NC02 multipleksine ait elektroforegramı

4.4. D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441, D1S1677 Yeni Mini STR Lokuslarının Kan ve Kan Lekelerinde Optimizasyonuna Ek Çalışmalar

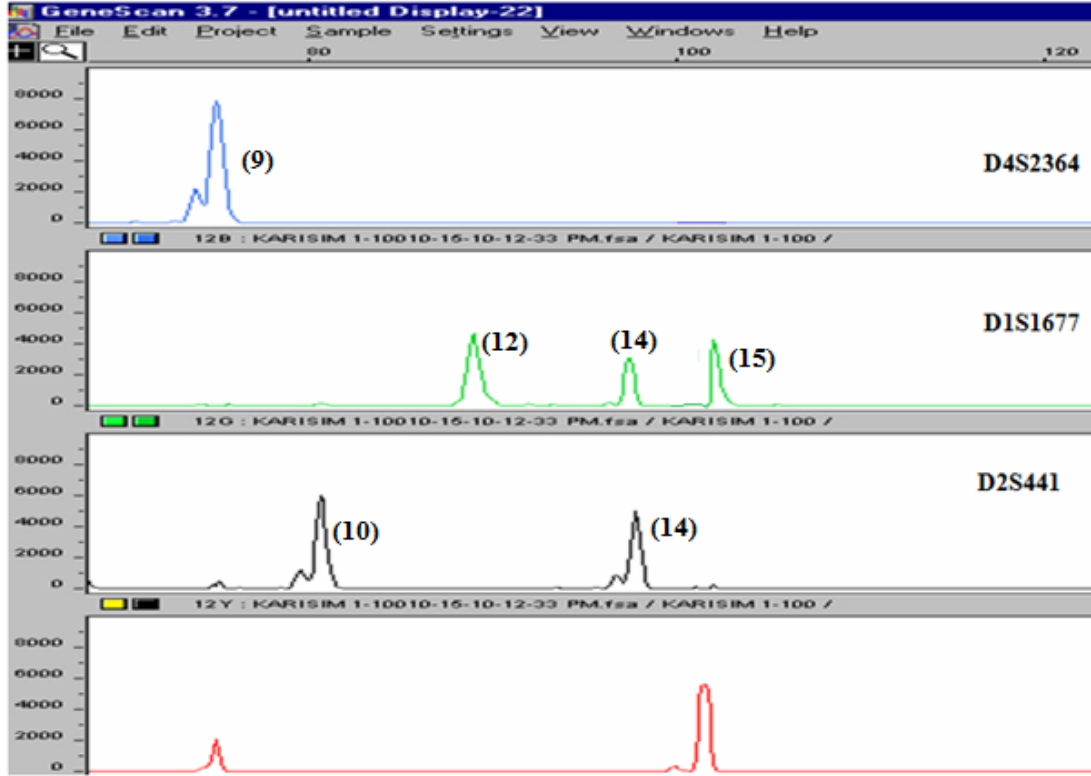
- **Tekrarlanabilirlik için;** 6 miniSTR lokusu belirlenmiş olan 2 kişiye ait örnek, 4 kez farklı zamanlarda çalışıldı. Her defasında aynı lokusa ait aynı alel tipi gözlemlendi.
- **Karışım çalışması için;** çeşitli oranlarda (1/10, 1/100 ve 1/1000) karıştırılmış olan 2 kişiye ait kan örneklerinin, belirtilen her oranda 6 STR lokusu tiplendirildi. Alel tipleri Tablo 15’te verilmiştir. Karışım örneklerine ait NC01 ve NC02 multipleksine ait elektroforegramlar şekil 33 ve 34’de verilmiştir.

Tablo 15: Karışım örneklerde 6 miniSTR lokusuna ait alel profili

Örnek	Karışım 1/10	Karışım 1/100	Karışım 1/1000
LOKUS	Alel Tipleri		
D1S1677	12 /14 /15	12 /14/ 15	12 /14 /15
D2S441	10 / 14	10 / 14	10 / 14
D4S2364	9	9	9
D10S1248	13/ 16	13/ 16	13/ 16
D14S1434	10/13,3	10/13,3	10/13,3
D22S1045	12/13/14/15	12/13/14/15	12/13/14/15



Şekil 33. 1/100 karışım örneğinde NC01 multipleksine ait elektroforegram

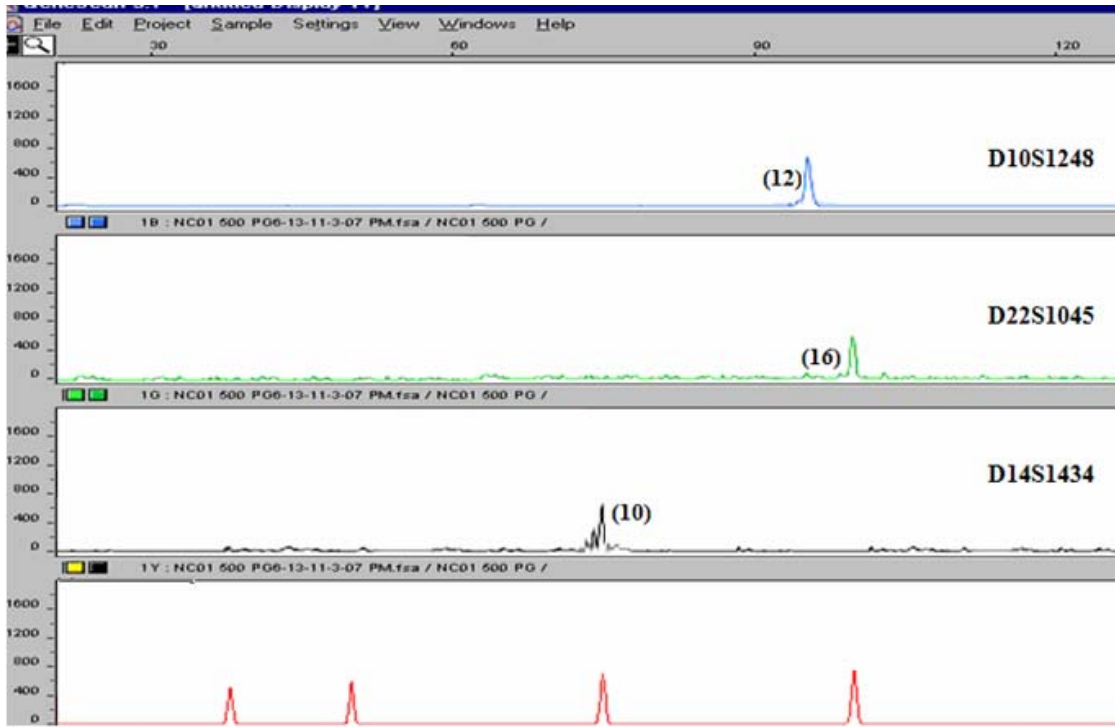


Şekil 34. 1/100 karışım örneğinde NC02 multipleksine ait elektroforegram

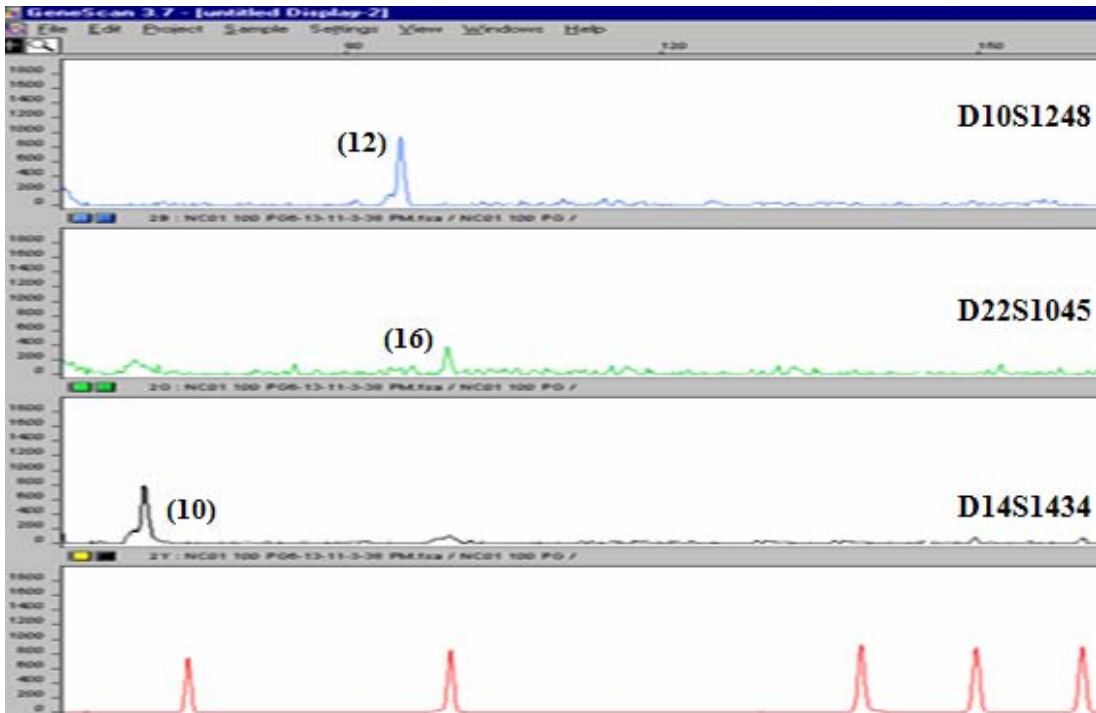
- **Duyarluluk çalışması için;** (K562) kontrol DNA örneği sulandırılarak 0.005, 0.025, 0.05, 0.1 ve 0.5 ng/μl konsantrasyonları çalışılarak, 6 miniSTR lokusu için kullanılabilir en az miktardaki DNA oranı belirlendi (Tablo 16). 0,5 ve 0,1 ng/μl DNA ile pik elde edilebildiği gözlemlendi. 0.05, 0.025 ve 0.005 ng/μl DNA ile pik elde edilemedi. DNA konsantrasyonlarına göre NC01 ve NC02'ye ait elektroforegram Şekil 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 ve 44'te gösterilmiştir.

Tablo 16: 6 miniSTR lokusunun DNA oranlarına göre hassasiyet sonuçları

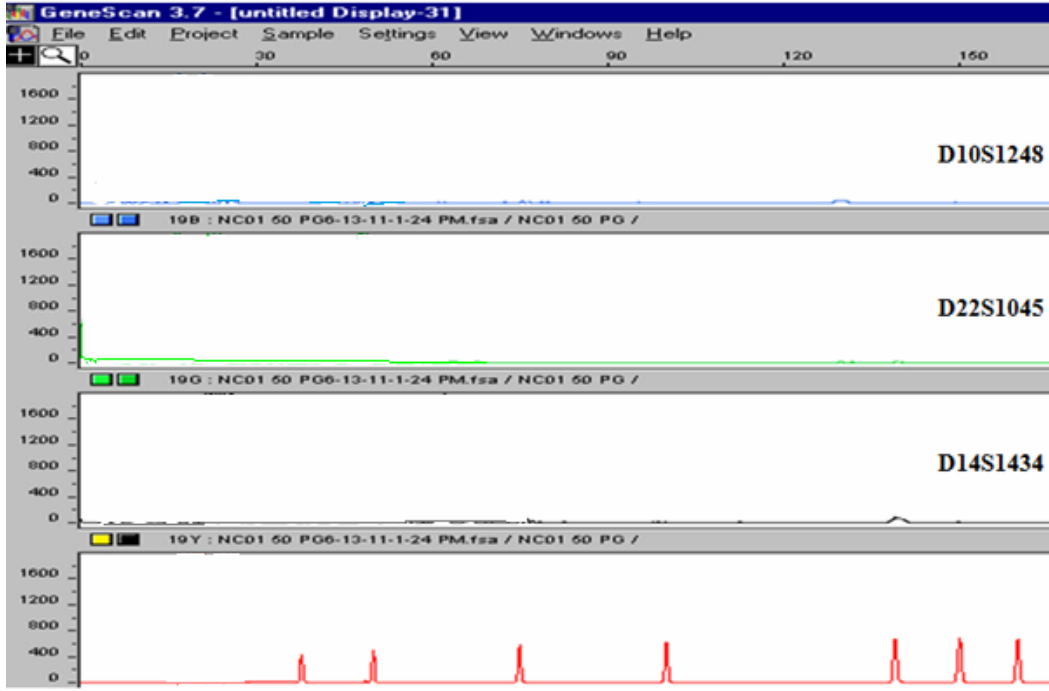
<u>LOKUS</u>	0,005 ng/μl	0,025 ng/μl	0,05 ng/μl	0,1 ng/μl	0,5 ng/μl
<u>D1S1677</u>	-	-	-	+	+
<u>D2S441</u>	-	-	-	+	+
<u>D4S2364</u>	-	-	-	+	+
<u>D10S1248</u>	-	-	-	+	+
<u>D14S1434</u>	-	-	-	+	+
<u>D22S1045</u>	-	-	-	+	+



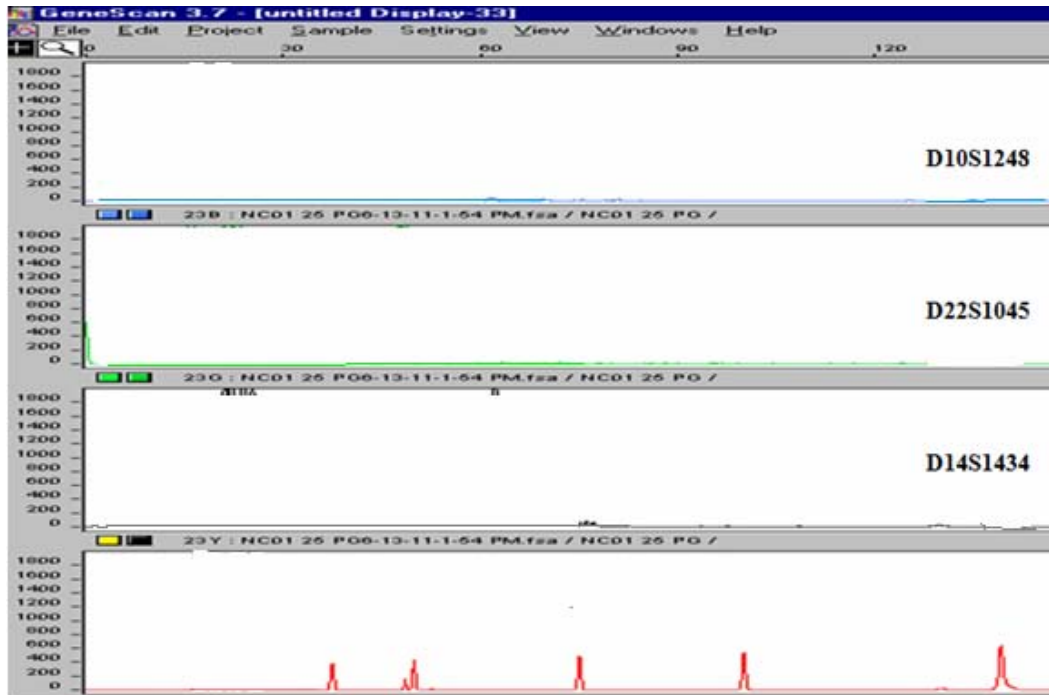
Şekil 35. 0,5 ng/μl DNA konsantrasyonunda NC01 multipleksine ait elektroforegram



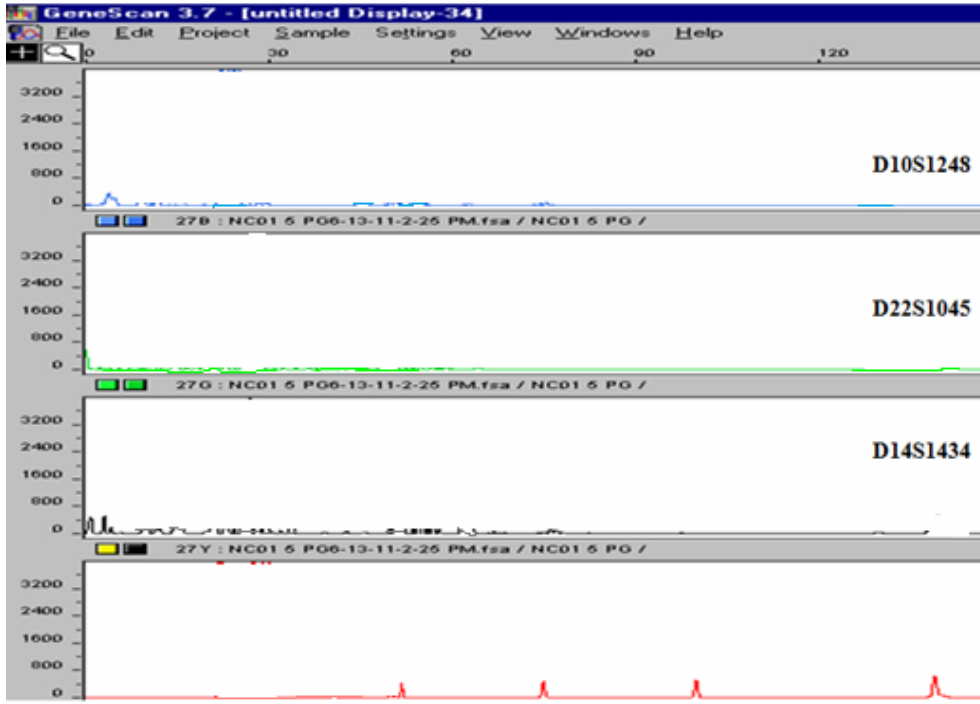
Şekil 36. 0,1 ng/μl DNA konsantrasyonunda NC01 multipleksine ait elektroforegram



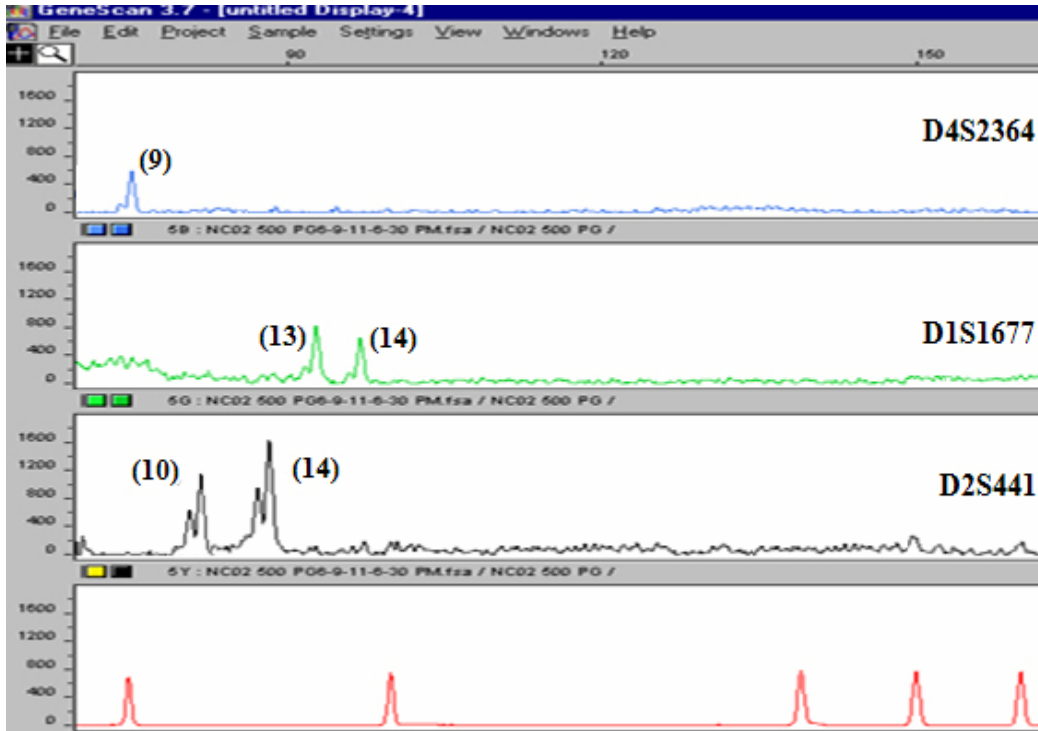
Şekil 37. 0,05 ng/µl DNA konsantrasyonunda NC01 Multipleksine Ait Elektroforegram



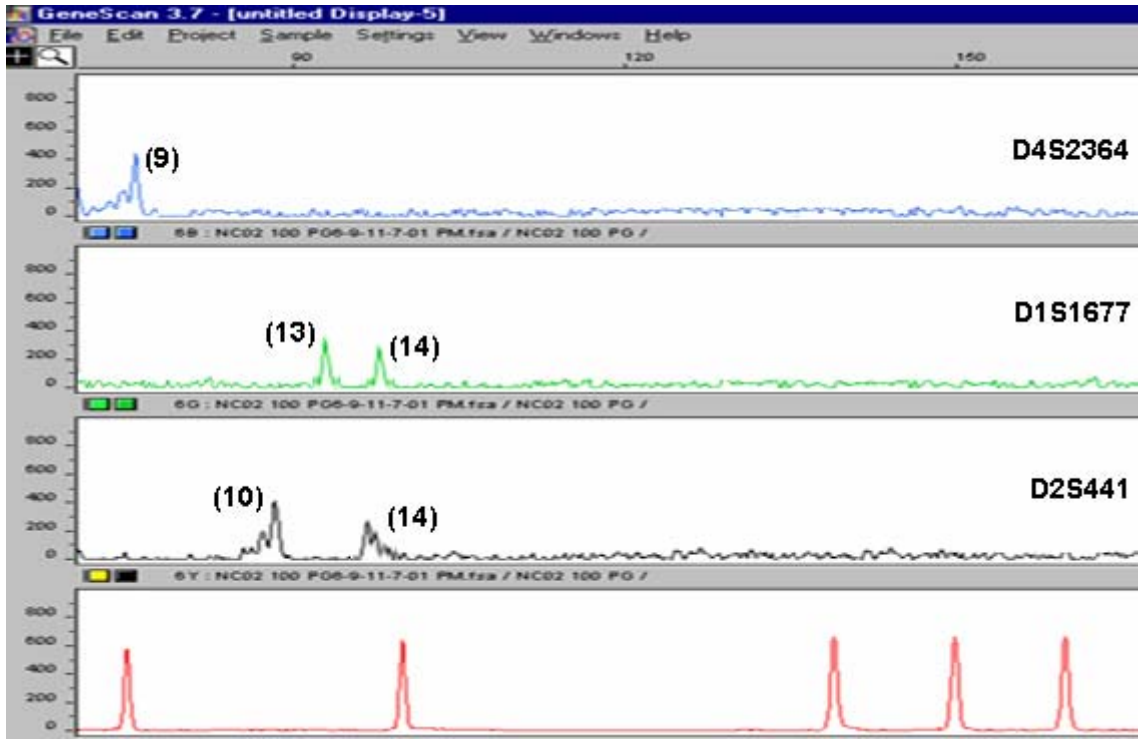
Şekil 38. 0,025 ng/µl DNA konsantrasyonunda NC01 multipleksine ait elektroforegram



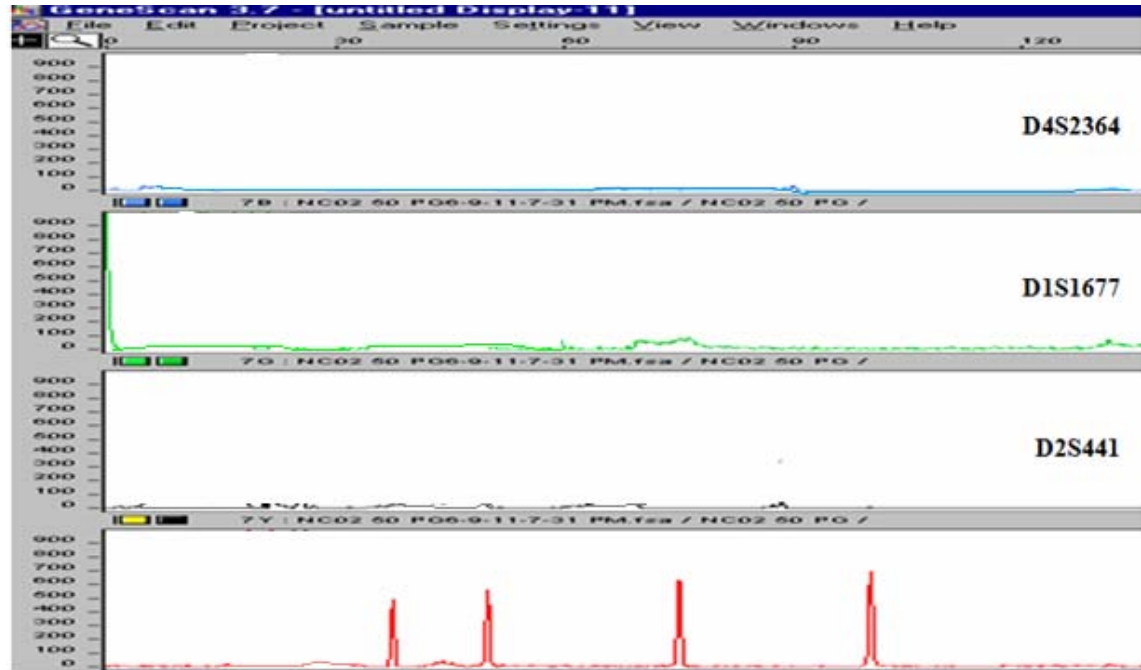
Şekil 39. 0,005 ng/µl DNA konsantrasyonunda NC01 multipleksine ait elektroforegram



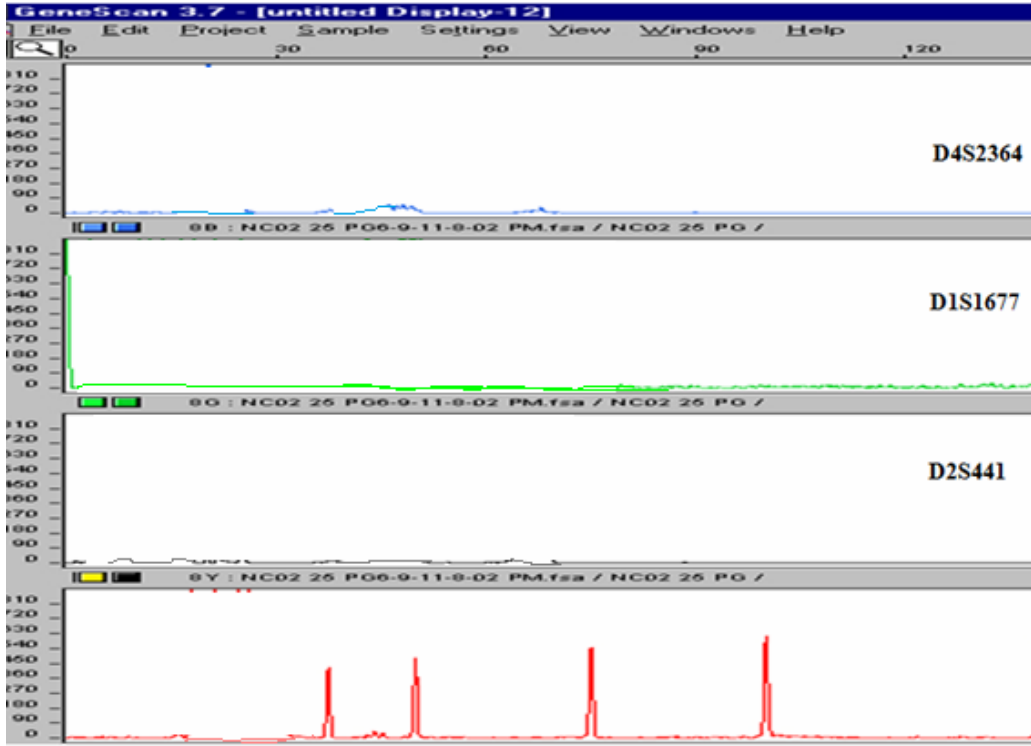
Şekil 40. 0,5 ng/µl DNA konsantrasyonunda NC02 multipleksine ait elektroforegram



Şekil 41. 0,1 ng/µl DNA konsantrasyonunda NC02 multipleksine ait elektroforegram



Şekil 42. 0,05 ng/µl DNA konsantrasyonunda NC02 multipleksine ait elektroforegram



Şekil 43. 0,025 ng/μl DNA konsantrasyonunda NC02 multipleksine ait elektroforegram



Şekil 44. 0,005 ng/μl DNA konsantrasyonunda NC02 multipleksine ait elektroforegram

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde babalık - akrabalık ilişkilerinin belirlenmesi ve kriminal araştırmalarda olay yerinden toplanan biyolojik örneklerin (kan, kan lekesi, semen, semen lekesi, tükürük, tükürük lekesi kıl, kemik v.s) kimliklendirilmesinde STR lokusları kullanılmaktadır. Bu lokusların lokuslarının alel büyüklüklerinin 350 bç'den (baz çiftinden) küçük olması, eski ve iyi korunmamış biyolojik örneklerde tiplenebilmesi, ayrıca otomasyon ve çoklu analize imkan vermesi, pahalı donanım gerektirmemesi ve hemen hemen tüm Dünya popülasyonlarında alel sıklıklarının bilinmesi bu lokusları ideal genetik işaretler haline getirmiştir (Weber J.L. May P.E. 1989) (Edwards A. ve ark. 1992) (Filoğlu G. 1999).

FBI tarafından kurulmuş DNA veri bankası CODIS (Combined DNA Index Systems)'in belirlediği 13 STR lokusunu içeren multipleks PCR ticari kitleri hala kullanılmakla beraber, olay yerinden gelen aşırı derecede bozulmuş biyolojik örneklerde tiplene sorunları yaşanmaktadır (Coble M.D. ve ark. 2005). Bu sorunları ortadan kaldırmaya yönelik, CODIS içerisinde yer almayan, National Institute of Standards and Technology (NIST) tarafından 26 yeni mini STR lokusu geliştirilmiştir. Bu lokusların PCR ürünleri 150 baz çiftinden küçüktür. Özellikle D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441, D1S1677 STR lokuslarının PCR ürünleri 125 bç den küçüktür. Olay yerinde bulunan eski ve bozulmuş biyolojik örneklerin DNA tiplene yapılabilirdiğinden söz konusu lokusların çeşitli ülkelerde validasyonu ve optimizasyonu yapılarak adli laboratuvarların rutin kullanımına sunulmuştur. Bu lokuslardan D10S1248, D2S441 ve D22S1045 Avrupa'da benimsenmiş ve adli laboratuvarlarda kişi identifikasyonları için kullanılan STR lokuslarına eklenmiştir (Coble M.D. ve ark. 2005) (Hill C.R. ve ark. 2006).

Bu tez çalışmasındaki amaç; D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441, D1S1677 yeni miniSTR lokuslarının optimizasyonu ve Türkiye'deki adli laboratuvarlarda olay yerinden gelen, eser miktarda, iyi korunmamış ve beklemiş örneklerde uygulanabilirliğini sağlamaktır.

6 yeni mini STR lokusunun optimizasyonunda sırasıyla şu aşamalar uygulandı.

- D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441, D1S1677 6 yeni miniSTR lokusuna ait primerlerin floresan boyalarla işaretlenmesi
- 6 yeni mini STR lokusunun PCR reaksiyon bileşenlerinin seçimi ve optimizasyonu
- 6 yeni mini STR lokusuna ait primer konsantrasyonlarının belirlenmesi ve optimizasyonu,
- 30 kişiye ait kan örneklerinde 6 miniSTR lokusunun tiplendirilmesi,
- Optimizasyona ek yapılan çalışmalar (tekrarlanabilirlik, duyarlılık, karışım çalışması),
- Çeşitli yüzeyler üzerinde ve çeşitli sürelerde bekletilmiş kan lekelerinde 6 miniSTR lokusunun tiplendirilmesi

D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441, D1S1677 6 yeni miniSTR lokusuna ait primerlerin floresan boyalarla işaretlenmesi

NIST (National Institute of Standards and Technology)'de geliştirilen 26 yeni mini STR lokusu içerisindeki D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441, D1S1677 lokuslarının optimizasyon ve validasyon çalışmalarının öncüsü olan Coble M.D. ve ark.'nın 2005'teki çalışmaları bu tez çalışmasında temel alınmıştır. Bu yayında lokuslara ait primerlerden; D1S1677 ve D22S1045 NED ile, D2S441ve D14S1434 VIC ile, D4S2364 ve D10S1248 FAM ile işaretlenmiştir.

Bu tez çalışmasında kullanılmak üzere primer siparişi verilen firma bu boyaları temin edemediğinden boyalar üzerinde değişiklik yapılmak zorunda kalınmıştır. Çalışmada kullanılan ABI PRISIM® 310 genetik analizörü için belli matriks standartı ve bu standartlara uygun floresan boya setleri bulunmaktadır. Bu boya setinden firmanın primerleri işaretleyebileceği ve bu çalışma için uygun olan FAM, HEX, TET ve TAMRA floresan boya setini içeren DS-34 matrix standartı seçildi. Primerler bu boya setine uyumlu olacak şekilde; D1S1677 ve D22S1045 TET, D2S441ve D14S1434 HEX, D4S2364 ve D10S1248 FAM ile işaretlendi. Coble M.D. ve ark.'nın çalışmasında D2S441ve D14S1434 lokus primerleri VIC ile işaretli olduğundan DS-32-

33 matriks standartları kullanıldığında, ABI PRISM® 310'da ilgili lokusun pikleri yeşil renkte görülmektedir. Bu çalışmada D2S441ve D14S1434 lokus primerleri HEX ile işaretlendiğinden DS-34 matriks standartında ilgili lokuslar sarı renkte pik vermektedir. Yine aynı şekilde NED ile işaretliyen sarı renkte pik veren D1S1677 ve D22S1045, TET ile işaretlendiğinde DS-34 matriks standartına göre yeşil renkte pik vermektedir. Coble M.D. ve ark.'nın yaptığı çalışmada belirtilen floresan boyalara uyumlu matriks standart DS-32 ve DS-33'tür. Buna uyumlu kullanılan size standart ise GS-500 LIZ'dir (Applied Biosystems). Bu tez çalışmasında ise DS-34 matriks standarta uygun TAMRA size standart kullanıldı. Kullanılan floresan boyalar ile 9947A ve K562 pozitif kontroller çalışılarak elde edilen PCR ürünleri ABI PRISM® 310 genetik analizörde oluşturulan matriks standart ile analiz edildiğinde 6 lokusa ait alel pikleri doğru yerde tespit edildi.

6 yeni mini STR lokusunun PCR reaksiyon bileşenlerinin seçimi ve optimizasyonu

Coble M.D. ve ark.'nın PCR reaksiyonu için kullandıkları bileşenler MgCl₂ (25mM), 10X PCR tamponu, 10mM dNTPs, BSA (3,2 mg/mL), TaqGold DNA Polymerase (5 U/μL), dH₂O'dur. Bu tez çalışmasında ise; PCR bileşenlerini tek tek kullanmak yerine TopTaq™ Master Mix Kit - QIAGEN® ticari PCR karışımı kullanıldı. Bu kitin tercih edilmesinin nedeni maliyetinin düşük olması, multipleks PCR çalışmaları için optimize edilmiş olması, kolay olması ve kısa sürmesi ayrıca primer haricinde tüm PCR karışımı bir seferde alındığından kontaminasyon riski en aza indirgenmektedir (TopTaq™ PCR Handbook, 2010).

Kitin manuelinde belirtilen bir PCR reaksiyonu için kullanılması gereken Top Taq™ Master Mix miktarını ve eklenmesi gereken primer miktarı kullanıldı. Yalnız, kitin önerdiği PCR döngü koşulları uygulandığında sonuç alınamadı. Bu nedenle PCR döngü koşullarında Coble M.D. ve ark.'nın uygulamış olduğu PCR döngü programı kullanıldı. Ancak 28 olan döngü sayısı 32'ye yükseltildiğinde daha iyi sonuçlar (pikler) elde edildi.

Sonuç olarak 6 mini STR lokusuna ait PCR reaksiyonu; Top Taq™ Master Mix Kiti kullanıldı ve 6 lokus, 3'lü multipleks reaksiyonlar şeklinde çalışıldı. PCR programında

Coble M.D. ve ark.'nın kullandığı programın döngü sayısı 32'ye yükseltilerek uygulandı. Çalışmadaki tüm örneklerin PCR'ları bu koşullara uygun şekilde gerçekleştirildi. Yapılan bu PCR optimizasyonu ile Top Taq™ Master Mix Kit'inin 6 yeni miniSTR lokus analizinde kullanılabileceği belirlendi.

6 yeni mini STR lokusuna ait primer konsantrasyonlarının belirlenmesi ve optimizasyonu

6 yeni miniSTR lokusu için Coble M.D. ve ark. tarafından daha önce belirlenmiş olan primer konsantrasyonları (Tablo 8) (Coble M.D. ve ark. 2005) kullanıldı. Ancak bu konsantrasyonlarda istenildiği gibi pik (pikler küçük ya da gözlemlenemedi) elde edilemedi (Şekil 13 – 14). Dolayısıyla çeşitli primer konsantrasyonları hazırlanarak Top Taq™ Master Mix Kit kullanarak birçok PCR denemeleri yapıldı.

Yapılan denemeler sonucunda 6 lokusa ait piklerin en iyi boyutta elde edildiği primer konsantrasyonları: D1S1677 1,5 µM, D2S441 1,7 µM, D4S2364 1,3 µM, D10S1248 1,6 µM, D14S1434 1,8 µM ve D22S1045 1,5 µM olarak belirlenmiş oldu (Tablo 8) (Şekil 21- 22).

6 miniSTR lokusu PCR aşaması, yukarıda anlatıldığı şekilde optimize edildikten sonra 30 kişiye ait kan örneği ve çeşitli yüzeyler üzerinde (kot, penye, havlu, döşeme, bıçak kabzası, kapı kilit demiri, kalebodur arası dolgu-derz ve laminant parke) 1 hafta, 1ay, 3 ay ve 6 ay bekletilmiş kan örnekleri çalışıldı.

30 kişiye ait kan örneklerinde 6 miniSTR lokusunun tiplendirilmesi

İlk çalışılan örnekleri tiplendirmek için bir alelik ladder'a (alelik cetvel) ihtiyaç vardı. Yeni miniSTR lokuslarına ait ticari PCR kitleri tez çalışması devam ederken henüz üretilmemişti. Dolayısıyla hazır alelik ladder olmadığından miniSTR piklerini değerlendirmek için; bu tez çalışmasında temel alınan ana makalenin yazarı, Dr. Michael D. Coble ile iletişime geçildi. Coble M.D. yeni miniSTR'lerle ilgili NIST'te yaptıkları çalışmalarda alel tiplerini belirledikleri pozitif kontrol DNA'ları (Şekil 11) ilk

etapta bir cetvel gibi kullandık. Bu pozitif kontrol örneklerinin (9947A - K562) PCR'ı yapılarak tiplendirilecek her örnekle beraber aynı anda elektroforezde yürütüldü, örneklerle karşılaştırılarak alel tipleri belirlendi. Ayrıca yine NIST'te yapılan diğer bir çalışmada da 26 yeni miniSTR lokusunun her bir aleline ait alel büyüklüğünü (size) gösteren tablo da kullanıldı (Tablo 9) (Hill C.R. ve ark. 2006-A). Buna göre 30 kişiye ait kan örneklerinin alel tipleri belirlenmiş oldu (Tablo 10).

Optimizasyona ek yapılan çalışmalar (tekrarlanabilirlik, duyarlılık, karışım çalışması)

Bu tez çalışmasında optimizasyona ek olarak; tekrarlanabilirlik, duyarlılık ve karışım çalışmaları yapıldı.

Tekrarlanabilirlik çalışmasında; 6 yeni miniSTR lokusu için; FAM, HEX, TET ile işaretli primerler ve Top Taq™ Master Mix Kit'i kullanılarak PCR yapıldı. Elektroforezde bu boyalara uyumlu matriks standart DS-34 kullanılarak, 2 adet örneğe farklı zamanlarda 4 kez PCR ve elektroforez işlemleri uygulandı. Her seferinde 6 miniSTR lokusu için aynı alel profili elde edildi.

Karışım çalışmasında; 1/10, 1/100 ve 1/1000 oranında karıştırılan 2 kişiye ait kan örneklerinde, her oranda her iki kişiye ait 6 STR lokusuna ait tam profil elde edildi. Bu da 6 miniSTR lokusunun karışım örneklerinde uygulanabileceğini göstermektedir.

Duyarlılık çalışmasında; 0,5 – 0,1 – 0,05 – 0,025 – 0,005 ng/µl DNA miktarlarıyla yapılan analizlerde; 0,5 ve 0,1 ng/µl DNA ile tüm profil elde edildi. Diğer konsantrasyonlarda ise hiç pik gözlenmedi. Bu çalışma sonucunda 6 yeni miniSTR lokusuna ait analizlerde kullanılacak en az DNA miktarının 0,1 ng/µl olduğu saptanmış oldu.

Çeşitli yüzeyler üzerinde ve çeşitli sürelerde bekletilmiş kan lekelerinde 6 miniSTR lokusunun tiplendirilmesi

13 CODIS STR lokusunu içeren multipleks PCR ticari kitleri kullanılarak olay yerinden gelen aşırı derecede bozulmuş biyolojik örneklerde tiplendirme sorunları yaşandığı ve sonuç alınmadığı bilinmektedir (Coble M.D. ve ark. 2005). Olay yerinde en sık rastlanan biyolojik delil kan lekeleridir. Olayın oluş şekline göre bu lekelerin ne kadar süre beklediğini bazen bilemeyebiliriz. Olayın üstünden haftalar, aylar hatta yıllar geçebilmektedir. Ayrıca bu lekeler çeşitli yüzeyler üzerinde de bulunabilirler. Olay yerinde en çok karşılaşılan durumlar: Kanın; penye, havlu, döşeme gibi yüzeylere bulaşmış olması, kapı, kalebodur, parke gibi yüzeylere sıçraması ya da akması ve en çok kullanılan cinayet aletlerinde biri olan bıçağın kabzasına sızmasıdır. Bu amaçla kan lekelerinin, olay yerinde en çok karşılaşılabilecek yüzeylere; kot, penye, havlu, döşeme, bıçak kabzası, kapı kilit demiri, laminant parke, kalebodur arası dolgu-derz üzerinde 1 hafta, 1 ay, 3 ay ve 6 ay boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Tüm yüzeylerde ve sürelerde bekletilmiş kan lekelerinin hepsinde 6 miniSTR lokusu başarıyla tiplendirildi.

Sonuçta 6 ay beklemiş kan lekelerinde miniSTR lokusları kullanılarak olay yerinde beklemiş kan lekelerinden kimliklendirme yapılabileceği saptanmıştır. Bu tez çalışmasında süre kısıtlı olduğu için bekletme 6. ayda sonlandırılmıştır. Ancak bu süre uzatılarak bir ya da birkaç yıl bekletilmiş kan lekelerinde de çalışılabilir.

Sonuç olarak; 6 yeni miniSTR lokusunun bu tez çalışmasında 30 kişiye ait kan örneklerinde çalışılarak optimizasyonu yapılmıştır. Ayrıca 1 hafta, 1 ay, 3 ay ve 6 ay bekletilmiş kan lekelerinde de lokuslara ait alel tipleri belirlenebilmiştir. Bu sonuçlar çerçevesinde 6 yeni miniSTR lokusunun az miktarda ve beklemiş kan lekeleriyle çalışılabildiğini dolayısıyla bu amaca yönelik rutin adli bilimler laboratuvarlarında kullanılabileceği belirlenmiş oldu. Ancak bu tez çalışmasında yer alan 6 yeni miniSTR lokusunun Türkiye'deki rutin adli laboratuvarlarda çalışabilmesi için bu lokusların Türkiye popülasyonundaki gen sıklığının bilinmesi gerekir. Bu tez çalışmasında çalışılan 30 kişi popülasyon çalışması için öncü bir çalışma niteliğindedir.

6. ÖZET

DNA analizlerinde yaklaşık 20 seneden bu yana kullanılan STR analizlerinin; insana özgün olması, parçalanmış ve çok az miktarda DNA içeren örneklerle çalışılabilmesi, analizin kısa sürmesi, sonuçların kolaylıkla değerlendirilebilmesi, birden fazla STR lokusunun aynı anda çalışılabilmesi, heterozigotluk oranlarının yüksek olması ve yüksek polimorfizm göstermeleri nedeniyle bu lokuslar adli bilimlerde ideal genetik işaretler olarak günümüzde hala kullanılmaktadırlar. Ayrıca Dünya'nın bir çok popülasyonunda gen sıklıklarının belirlenmiş olması ve bu lokuslarla ilgili DNA bankalarının oluşturulmuş olması ve kullanılması bu sistemleri vazgeçilmez kılıyor.

Ancak olay yerinden gelen aşırı derecede bozulmuş örneklerde ya da eser miktarda bulunan örneklerde hala tiplleme sorunu yaşanabilmekte ve sonuç alınmadığı görülmektedir. Bunu önlemeye yönelik, eser miktardaki örneklerden DNA elde etmek amacıyla, DNA üzerinde daha az yer kaplayan, küçük boyutlu 26 yeni miniSTR lokusu National Institute of Standards and Technology (NIST) tarafından geliştirilmiştir. Belirlenen ilk 6 lokusun PCR ürünleri 125 bp den küçüktür (D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441, D1S1677). Bu lokusların çeşitli ülkelerde validasyon ve optimizasyonu yapılmış, bozulmuş örneklerde kullanılabilirliği saptanmıştır. Ayrıca bu lokuslardan üçü (D10S1248, D2S441 ve D22S1045) Avrupa toplumu tarafından benimsenmiş ve adli laboratuarlarda kişi identifikasyonları için kullanılan STR'lere eklenmiştir.

Bu çalışmada, belirlenen bu 6 lokusun Türkiye'deki adli laboratuarlarda kullanımını sağlamak için, bu lokusların optimizasyon çalışması yapıldı. Bunun için Coble M. D. ve ark. yaptıkları çalışma temel alınarak üzerinde çeşitli modifikasyonlar yapıldı. Primerler FAM, VIC, NED floresan boya yerine FAM, TET, HEX olarak değiştirildi. Boyalara uygun olarak, DS-34 Matrix standart, size standart olarak ta TAMRA-350 kullanıldı. PCR döngü programı aynı şekilde uygulandı, sadece döngü sayısı 32 'ye yükseltildi. Primer konsantrasyonları D1S1677 1,3 µM'dan 1,5'e, D2S441 0,7 µM'dan 1,7'ye, D4S2364 1,1 µM'dan 1,3'e D10S1248 1,3µM'dan 1,6'ya, D14S1434 1,3 µM'dan 1,8'e, D22S1045 0,8 µM'dan 1,5'e yükseltildi. PCR bileşenlerini ayrı ayrı

eklemek yerine primer hariç tüm karışımı içeren Top Taq™ Master Mix (Qiagen) kullanıldı.

6 mini STR lokusun PCR reaksiyonu 3'lü multiplex halinde çalışıldı. Söz konusu lokusların uzun süre beklemiş örneklerde uygulanabilirliğini saptamak için; kot, penye, havlu, döşeme, demir, bıçak kabzası, laminant parke, kalebodur üzerinde kan lekeleri oluşturularak 1 hafta, 1 ay, 3 ay ve 6 ay bekletildi. Tüm yüzeylerde ve sürelerde bekletilmiş kan lekelerinde 6 mini STR lokusu başarıyla tiplendirildi.

Optimizasyon çalışmasına ek olarak; tekrarlanabilirlik, duyarlılık ve karışım çalışması yapıldı. Tekrarlanabilirlikte; farklı zamanlarda yapılan çalışmada aynı profil elde edildi. karışım çalışmasında; 1/10, 1/100 ve 1/10000 karışımlarında başarıyla ayırım sağlandı. Duyarlılık çalışmasında; 6 miniSTR lokusu tiplendirmek için 0,1ng/μl DNA'nın yeterli olduğu belirlendi.

Sonuç olarak; 6 miniSTR lokusun optimizasyonu yapıldı ve 6 ay bekletilmiş kan lekelerinde söz konusu lokusların kimliklendirmede kullanılabileceği saptandı.

7. SUMMARY

DNA analyses with STR markers which have been use of last tekology since 20 years are ideal genetic markers in forensic sciences study. Because DNA analyses with STR markers; sensitive and specific, study with degraded DNA and trace amounts of biyological sample, give results in short time, utility results samply, allow to study with multiplex STR locus, high polimorphisym and high heterozygote rate. Also many population in the world the gene frequencies is determined. About these loci DNA databases are created and used. So these systems make them essential.

But, there have been cause of DNA typing in highly degraded forensic cases and trace amounts of biyological sample. With the purpose of remove the cause; lots of study have been done. We have scanned the literature, saw that, National Institute of Standards and Technology (NIST) had developted 26 new miniSTR loci which is unlinked from the CODIS markers, which can generate amplicons less than 150 bp in size and would therefore be helpful in testing degraded DNA samples. 6 of this loci: (D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441, D1S1677) amplicons less than 125 bp. Lots of country have validated and optimized this locus in their populations. Also 3 of them: D10S1248, D2S441, D22S1045 were adopted by the European community as recommended STRs for adding to their core genetic systems used for human identity testing.

In this study; To see usability of these loci in Turkish forensic laboratory we validated and optimized this locus with 30 human blood sample. The way of STR typing steps applyed in this study: Extraction and isolation DNA from samples, amplification of STR markers with PCR, electrophoretical Separation of PCR Amplificon, to be appearance of allele, utility of results.

Lots of modification were made on PCR method of Coble M.D. at all. (2005). Primer Dye set should be FAM-TET-HEX rather than FAM-VIC-NED. For this dye set, DS-34 Matrix standart and TAMRA-350 size standart were applied on ABI 310 Genetik analyser. PCR condition was the same but cycle was raised to 32. Primer consantrations

were changed. Old concentrations: D1S1677 1,3 μM , D2S441 0,7 μM , D4S2364 1,1 μM , D10S1248 1,3 μM , D14S1434 1,3 μM , D22S1045 0,8 μM .

New concentrations: D1S1677 1,5 μM , D2S441 1,7 μM , D4S2364 1,3 μM , D10S1248 1,6 μM , D14S1434 1,8 μM , D22S1045 1,8 μM .

Top Taq Master Mix(Qiagen) was used which is contain all of PCR components except Primer.

To see usability of this method in waited a long time forensic cases, blood was dropped on jean, t-short, upholstery fabric, towel, iron, knife hilt, laminate flooring and tile which were at the scene of most common objects. These objects were waited for 1 week, 1 month, 3 months and 6 months. Even if the method could be used for the samples in this study waited for 6 months.

In addition to optimization, sample was started up again in different time. Mix sample was studied. Study of DNA Sensitivity was made (range to 0,005- 0,5 ng/ μl). It was determined that 0,1 ng/ μl DNA is enough to identification of 6 miniSTR loci.

As a result of, 6 loci were optimized and usability of these 6 loci were verified in Turkish Forensic Laboratory and it was established that, the usability of these loci with even waited for six months dried blood spots samples.

8. KAYNAKLAR

ABI Prism 310 Genetic Analyzer User's Guide (2001) Applied Biosystems, USA.

Alford R.L., Hammond H.A., Coto I., Caskey C.T., (1994) Rapid and efficient resolution of parantage by amplification of short tandem repeats. Am J Hum Genet; 55: 190-5.

AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplification Kit User's Manuel (2001) Applied Biosystems, USA.

Bar W., Brinkmann, B., Lincoln P., Mayr W.R. and Rossi U. (1994) DNA recommendations--1994 report concerning further recommendations of the DNA Commission of the ISFH regarding PCR-based polymorphisms in STR (short tandem repeat) systems, Int. J. Leg. Med; 107: 159-160.

Bender K., Fardan M. J., Schneider P. M. (2004) Preparation of degraded human DNA under controlled conditions, Forensic Science International; 139: 135-140.

Brinkmann B. (1992) The use of STR's in stain analysis, Proceedings from the Third International Symposium on Human Identification, Promega Corporation, Madison, USA: 357-73.

Budowle B., Moretti T. R. (1999) Genotype Profiles for Six Population Groups at the 13 CODIS Short Tandem Repeat Core Loci and Other PCR-Based Loci, Forensic Science Communications; Vol. 1, Num. 2: <http://www.fbi.gov/about-us/lab/forensic-science-communications/fsc/july1999/budowle.htm/>.

Buel E., Scwartz M. B., LaFountain M. J. (1998) Capillary electrophoresis STR analysis: Comparison to gel-based systems, J Forensic Sci; 43: 164-170.

Butler J. M., Shen Y., McCord B. R. (2003) The Development of Reduced Size STR Amplicons as Tools for Analysis of Degraded DNA, , J Forensic Sci; 48: 1054-1064.

Butler J. M., Buel E., Crivellente F., McCord B. R. (2004) Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis, Elektrophoresis; 25 : 1397-1412.

Butler J. M., (2005) Forensic Issues: Degrade DNA, PCR Inhibition, Contamination, Mixed Samples and Low Copy Number: 145-179.

Butler J. M. (2007) Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing, Bio Techniques; Vol 43, No 4: 2-4.

Capelli C., Tschentscher F., Pascali V. L. (2003) “Ancient” protocols for the crime scene? Similarities and differences between forensic genetics and ancient DNA analysis, Forensic Science International; 131: 59-64.

Carey L., Mitnik L. (2002) Trends in DNA forensic analysis, Electrophoresis; 23: 1386-1397.

Caskey C.T, Pizzuti A., Fu Y. H., Fenwick R. G., Nelson D. L. (1992) Triplet repeat mutations in human disease, Science; 256: 784-9.

Cerri N., Caenazzo L., Verzeletti A., Gasparini F., Ponzano F., Ceola F., Tozzo P., De Ferrari F. (2008) Population data for MiniNC01 in a population sample from North-eastern Italy and their use in neoplastic tissues fixed in formalin and embedded in paraffin, Forensic Science International, Genetics Supplement Series 1: 105-106.

Chan L. (1992) Advances in molecular biology with applications in clinical medicine, Klin Lab; 38: 2-4.

Coble M. D., Butler J. M. (2005), "Characterization of New MiniSTR Loci to Aid Analysis of Degraded DNA", J Forensic Science; Vol. 50: 43-53.

Deforce D. L. D., Millecamps R. E. M., Hoofstat D., Eeckhout E. G. (1998) Comparison of Slab gel electrophoresis and capillary electrophoresis for the detection of the fluorescently labeled polymerase chain reaction products of short tandem repeats fragments, J. Chromatogr. A; 806: 149-155.

Dival G. B. (1982) The application of electrophoretic techniques in the field of criminology. Electrophoresis; 6: 249-58.

Edwards A., Hammond H. A., Jin L., Caskey T., Chakraborty R. (1992) Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeats, Genomics; 12: 241-53.

Ewett I. W., Gill P. D., Scranage J. K., Weir B. S. (1996) Establishing the robustness of short-tandem-repeat statistics for forensic applications, Am J Hum Genet; 58: 398-407.

Filoğlu G. (1999) 7 Tetrametrik STR lokusunun kriminal identifikasyondaki önemi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul.

Frank W. E., Llewellyn B. E., Fish P. A., Riech A. K., Marracci T. L., Gandol D.W., Parker D., Carter R. R., Thibault S. M., (2001) Validation of the AmpFISTR profiler plus PCR amplification kit for use in forensic casework, J Forensic Sci; 46: 642-646.

Gaensleen R.E. (1984) Sourcebook in Forensic Serology, Immunology and Biochemistry, Washington USA Government Printing Office: 293-320.

GeneMapper® *ID-X* Software Version 1.0, Getting Started Guide (2007) Applied Biosystems, USA.

GeneScan Reference Guide (2000) Applied Biosystems, USA.

Gill P., Kirkham A. (2004) Development of a simulation model to assess the impact of contamination in casework using STRs. *J Forensic Sci*; 49(3): 485-491.

Gill P. (1987) Werrett DJ. Exclusion of a man charged with murder by DNA fingerprinting. *Forensic Sci Int*; 35: 145-8.

Gill P., Urquhart A., Millican E., Oldroyd N., Watson S., Sparkes R., Kimpton C. P., (1996) A new method of STR interpretation using inferential logic-development of a criminal intelligence database, *Int J Leg Med*; 109: 14-22.

Hammond H. A., Jin L., Zhong Y., Caskey C. T., Chakraborty R., (1994) Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification applications, *Am J Hum Genet*; 55: 175-89.

Hartzell B., Graham K., McCord B. (2003) Response of short tandem repeat systems to temperature and sizing methods, *Forensic Science International*; 133: 228-234.

Heler, C. (2001) Principles of DNA separation with capillary electrophoresis, *Electrophoresis*; 22: 629-643.

Hill C. R., Coble M. D., Butler J. M. (2006) - (A) Development of 27 New MiniSTR Loci for Improved Analysis of Degraded DNA Samples, Poster B105 at American Academy of Forensic Sciences, Seattle, WA.

Hill C. R., Coble M. D., Butler J. M. (2006) - (B) Characterization Of 26 New MiniSTR Loci, Poster #44 at Promega Meeting, Nashville, TN.

Hill C. R., Kline M. C., Coble M. D., Butler J. M. (2006) - (C) Helping to Improve Human Identity Testing: Development of 26 New miniSTR Loci as DNA Markers, Forensics and Homeland Security; Div.831.

Hoofstat D. E. O., Deforce D. L. D., Pauw I. P. H., Eeckhout E. G. (1999) DNA typing of fingerprints using capillary electrophoresis: Effect of dactyloscopic powders, Electrophoresis; 20: 2870-2876.

Howitt T., Johnson P., Cartton L., Rowlands D., Sullivan K. (2003) Proceeding of the 14. International symposium on human identification, Madison, Wisconsin: Promega Corporation. Available at:
<http://www.promega.com/geneticidprooc/ussymp14proc/oralpresentations/howitt.pdf>.

Jeffreys A. J., Wilson V., (1985) Thein SL. Hypervariable “minisatellit” regions in human DNA, Nature; 314: 67-73.

Lagane B., Treilhou M., Couderk F. (2000) Capillary electrophoresis: Theory, teaching approach and separation of oligosaccharides using in direct UV detection, Biochemistry and Molecular Biology Education; 28: 251-255.

Larsen L. A., Christiansen M., Vuust J., Anderson P. S. (2000) High throughput mutation screening by automated capillary electrophoresis, Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening; 3: 393-409.

Lee H. C., Ladd C., Bourke M. T., Pagliaro E., Tirnady F. (1994) DNA typing in forensic science I. Theory and background, Am J Forensic Med Pathol; 15: 269-82.

Lee H. C. ve Ladd C. (2001) Preservation and Collection of Biological Evidence, Croatian Medical Journal; 42(3): 225-228.

Lygo J. E., Johnson P. E., Holdaway D. J., Woodroffe S., Whitaker J. P., Clayton T. M., Kimpton C. P., Gill P. (1994) The validation of short tandem repeat (STR) loci for use in forensic casework, *Int J Legal Med*; 107(2): 77-89.

McCord B., (2003) Troubleshooting capillary electrophoresis systems: (www.promega.com).

Metwalley S. H., Al-Awadhi A., Abdulla S. M., Kasem L. A., Hadad N. (2003) Validation and comparative study of the AmpFISTR Identifiler™ and the PowerPlex™ 16 STR multiplex systems for forensic casework using capillary electrophoresis, *Forensic Science International*; 136 (suppl.1): 54-55.

Möller A., Meyer E., Brinkmann B. (1994) Different types of structural variation in STR's: HumFES/FPS, HumVWA and HumD21S11, *Int J Leg Med*; 106: 319-23.

The future of Forensic DNA Testing: Predictions of the research and development working group (2000) National Institute of Justice: (www.ojp.usdoj.gov/nij).

Nock T., Dove J., McCord B., Mao D. (2001) Temperature and pH studies of short tandem repeat systems using capillary electrophoresis at elevated pH, *Electrophoresis*; 22: 755-762.

Peloso G., Grignani P., Previdere C. (2007) Genetic characterisation of six miniSTR loci in an Italian population sample, *Forensic Science International; Genetics Supplement Series 1*: 356–357.

Porras S. P., Kenndler E. (2004) Formamide as a solvent for capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis*; 25: 2946-2958.

Promega Technical Manual GenePrint STRSystems Silver Stain Detection (2001) Promega, USA.

QIAamp® DNA Micro Handbook (2010) QIAGEN®, USA.

QIAamp® DNA Mini Kit and QIAamp® and DNA Blood Mini Kit Handbook (2001) QIAGEN®, USA.

Qubit ssDNA Assay Kit Quick Reference Card (2010) Invitrogen™, California.
www.invitrogen.com/qubit.

Ren J., (2000) High-throughput screening of genetic mutation/polymorphisms by capillary electrophoresis, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*; 3: 11-25.

Robertson J., Ross A. M., Burgayne L. A. (1990) *DNA in Forensic Science: Theory, Techniques and Applications*, London.

Rudin N., Inman K. (2002) *An introduction of forensic DNA analysis* CRC Pres LLC, Florida; 2nd edition: pp 97-131.

Saferstain R. (2001) - *A Criminalistics, An Introduction To Forensic Science*, Prentice Hall, New Jersey; Chaper 3: 62-73.

Saferstein R. (2001) - *B Criminalistics: An introduction to forensic science*, 7th edition, Prentice Hall, New Jersey; Chapter 2: 32-50.

Sambrook J., Russel D. W. (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Pres, New York; 3rd edition: pp 5.2-6.6.

Scherczinger CA., Ladd C., Bourke MT., Adamowicz MS., Johannes PM., Scherczinger R., Beesley T., Lee HC. (1999) A systematic analysis of PCR contamination, *J Forensic Sci*; 44(5): 1042-1045.

Schmitt C., Schmutzler A., Prinz M., Staak M. (1994) High sensitive DNA typing approaches for the analysis of forensic evidence: comparison of nested variable number of tandem repeats (VNTR) amplification and a short tandem repeats (STR) polymorphisms, *Forensic Sci Int*; 66: 29-41.

Sensabaugh G. F. (1991) Forensic application of the polymerase chain reaction. *J Forensic Sci Soc*; 31: 201-4.

Shriver M. D., Smith M. W., Jin L., Marcini A., Akey J. M., Deka R., Ferrell R. E. (1997) Ethnic-affiliation estimation by use of populationspecific DNA markers, *Am J Hum Genet*; 60: 957-64.

TopTaq™ PCR Handbook (2010) QIAGEN Sample and Assay Technologies, USA: www.qiagen.com.

Urquhart A., Kimpton P. C., Downes T. J., Gill P. (1994) Variation in short tandem repeat sequences- a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers, *Int J Leg Med*; 107: 13-20.

Weber J. L., May P. E. (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction, *Am J Hum Genet*; 44: 388-96.

Weedn V. W., Hicks J. W. (1998) The Unrealized Potential Of DNATesting, National Institute of Justice, Research in Action, USA; p: 1-8.

Wurmb-Schwark N., Schwark T., Harbeck M., Oehmichen M. (2004) A simple Duplex-PCR to evaluate the DNA quality of anthropological and forensic samples prior short tandem repeat typing, *Legal Medicine*; Volume 6, Issue 2: 80-88.

9. EKLER

AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

Bu form, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi, TUĞBA ÜNSAL tarafından hazırlanan “D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441, D1S1677 Yeni MiniSTR Lokuslarının Kan ve Kan Lekelerinde Optimizasyonu” konulu tez çalışması ile ilgilidir.

Bu çalışmanın amacı; D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441, D1S1677 yeni mini STR lokuslarının Türkiye’deki adli laboratuvarlarda olay yerinden gelen, iyi korunmamış eski ve bozulmuş örneklerde uygulanabilirliğini sağlamaktır. Bunun için, önce taze kan örneklerinde söz konusu lokusların optimizasyonu yapılacaktır. Daha sonra çeşitli objeler üzerinde ve değişik sürelerde bekletilmiş kan lekelerinde çalışılarak bu lokusların tiptemedeki hassasiyetleri saptanarak rutin adli tıp laboratuvarlarında çalışılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya katılacak gönüllü sayısı 20 ile 30 arasında değişmektedir. Gönüllü katılımcıdan alınacak numuneler (kan örnekleri) yalnızca adı geçen çalışmada, araştırmacı tarafından ve adı geçen yöntemler için kullanılacaktır.

Gönüllü katılımcının kimlik bilgileri son derece gizli tutulacaktır ve hiçbir surette kimse ile paylaşılmayacaktır. Bilgiler anonim olarak kullanılacaktır. Katılımcının çalışmadan herhangi bir neden ile ayrılması durumunda tüm kayıtları silinecek ve örnekleri derhal imha edilecektir.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” olarak kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası

Yaşı:

Tarih

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Tuğba ÜNSAL

Doğum Tarihi: 08.05.1986

Doğum Yeri: Sinop

E-posta: *tugbaunsal86@gmail.com*

EĞİTİM DURUMU:

- İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Yüksek lisans programı (2008 - Halen)
- Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2004 - 2008)
- Antalya Aldemir Atilla Konuk Anadolu Lisesi (2000 - 2004)

LİSANS BİTİRME TEZİ:

Havasal Kaynaklı 2.22.2 Kodlu Aktinomiset Suşundan Fermentasyonla Antibiyotik Üretimi Ve Antibiyotik Üretimini Artırılmasında Deneysel Tasarım Kullanılması, Eskişehir, 2008

YAYINLARI:

Ulusal Bildiriler:

1) İlhan S., Yenice-Gürsu B., Ünsal T., Altın A., İşcen-Filik C. (2008) Antibiyotik Üretimini Artırılmasında Deneysel Tasarım Kullanılarak Besinsel Gereksinimlerin Taranması, 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, Trabzon.

Uluslararası Bildiriler:

1) Ünsal T., Filoğlu G., Sipahi E., Rayimoğlu G. (2011) New Mini STR Loci D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441, D1S1677 Validation And Optimization On Blood And Blood Spots, 24th World Congress of the International Society for Forensic Genetics, Vienna.

2) Sipahi E., Filoğlu G., Ünsal T., Rayimoğlu G. (2011) Allel Frequencies Of NC02 Multiplex STR Loci (D1S1677, D2S441, D4S2364) In Turkey, 24th World Congress of the International Society for Forensic Genetics, Vienna.

Aldığı Kurs ve Sertifika Programları:

GMP (İyi Üretim Uygulamaları) Sertifikalı Eğitimi,
ESOGÜ – Kimyagerler Derneği, 2007